

IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER
TUMOR-ASSOZIIERTE ANTIGENE
BEIM OVARIALKARZINOM

Gundula Schnabl

Aus der Medizinischen Klinik II der Ludwig Maximilians-
Universität München (Direktor: Prof.Dr. G. Paumgartner)

IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER TUMOR-ASSOZIIERTE ANTIGENE
BEIM OVARIALKARZINOM

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Gundula Schnabl

aus

Füssen

1986

Berichterstatter:

Prof.Dr.med.R. Lamerz

Mitberichterstatter:

Prof.Dr.med.G. Paumgartner

Dekan:

Prof.Dr.med.W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung:

27.5.1986

1. Einleitung	1
2. Kindheit	2
3. Jugend	3
4. Studium	4
5. Beruf	5
6. Familie	6
7. Reisen	7
8. Kunst	8
9. Wissenschaft	9
10. Politik	10
11. Religion	11
12. Literatur	12
13. Musik	13
14. Sport	14
15. Gesundheit	15
16. Tod	16
17. Nachleben	17
18. Schluss	18



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Einführung	1 c
3. Gyn. Tumoren	2
3.1 Mammakarzinom	2
3.2 Collumkarzinom	4
3.3 Korpuskarzinom	4
3.4 Vulvakarzinom	5
3.5 Vaginalkarzinom	6
3.6 Chorionepitheliom	7
4. <u>Ovarialkarzinom</u>	7
4.1 Epidemiologie	7
4.2 Ätiologie	8
4.3 Histologie	9
4.4 Ausbreitung u. Metastasierung	10
4.5 Diagnostik	10
4.6 Stadieneinteilung	12
4.7 Therapie	12
4.7.1 Gutartige Tumoren	12
4.7.2 Maligne Tumoren	13
4.7.3 frgl. maligne Tumoren	13
4.8 Spezielle Therapie maligner Ovarial- tumoren	13
4.8.1 Operable Tumoren	13
4.8.2 Inoperable Tumoren	14
4.9 Prognose	15
5. <u>Allgemeine Tumorantigene</u>	16
5.1 CEA	16
5.1.1 Phys.-chem. Eigenschaften	17
5.1.2 Klinik	18
5.2 AFP	18
5.2.1 Phys.-chem. Eigenschaften	19
5.2.2 Klinik	20

5.3	Ferritin	21
5.3.1	Phys.-chem.Eigenschaften	22
5.3.2	Klinik	25
5.4	weitere Antigene	26
6.	<u>Fremduntersuchung bei gynäkologischen Tumoren</u>	28
6.1	Gewebeuntersuchungen	28
6.1.1	CEA	28
6.1.2	Andere	29
6.2	Serumuntersuchungen	37
6.2.1	CEA	37
6.2.2	AFP	45
6.2.3	Ferritin	46
6.2.4	weitere Antigene	47
7.	<u>Eigenuntersuchungen</u>	48
7.1	Material	48
7.2	Methodik	49
7.2.1	Analyt. Verfahren	49
7.2.1.1	Eiweißbestimmung	49
7.2.1.2	Immunelektrophorese	50
7.2.1.3	Ouchterlony (zweidimensionale Doppeldiffusion)	50
7.2.1.4	Radioimmunoassay	51
7.2.1.5	Berechnungen	57
7.2.1.6	Immunradiometrischer Assay	63
7.2.2	Präparative Verfahren	64
7.2.2.1	Gewebeextraktion	64
7.2.2.2	Homogenisation	65
7.2.2.3	Zentrifugation	65
7.2.2.4	Dialyse	65
7.2.2.5	Filtration-Einengung	66

7.2.2.6	Lyophilisation	66
7.2.2.7	Chromatographie	67
7.2.2.7.1	Gelfiltration	67
7.2.2.7.2	Anionenaustauscherchromatographie- DEAE-Zellulose	68
7.2.2.7.3	Immunadsorption-CN-Br.akt.Sepharose 4B	69
7.2.3	Herstellung von Antigenen	70
7.2.3.1	Immunisierung	70
7.2.3.2	Absorption	71
7.2.3.3	Reinigung der Immunsereen	72
7.2.4	Zentrifugation von Patientenseren	72
7.2.5	<u>Ergebnisse</u>	73
7.2.5.1	Gewebsverarbeitung	73
7.2.5.2	Elektropherogramm	73
7.2.5.3	Gelfiltration	74
7.2.5.4	Antigene	75
7.2.5.4.1	OCAA ₁ -Ferritin	75
7.2.5.4.2	OCAA ₂ -CEA	76
7.2.5.4.3	OCAA ₃	79
7.2.5.4.4	OCAA ₄	83
7.2.6	Klin.Untersuchungen - Serumbest.	85
7.2.6.1	Normalkollektive	85
7.2.6.2	Patientinnen mit Ov-ca-Altersver- teilung	86
7.2.6.2.1	OCAA ₁ -Ferritin	87
7.2.6.2.1.1	Ferritinverlaufsbestimmung	87
7.2.6.2.2	OCAA ₂ -CEA	88
7.2.6.2.3	AFP	89
7.2.6.2.4	OCAA ₃	90
7.2.6.2.5	OCAA ₄	90
7.2.6.2.6	weitere Serumparameter	90
7.2.6.2.6.1	BKS	90

	Seite
7.2.6.2.6.2 Hb	91
7.2.6.2.6.3 Hb _E	91
7.2.6.2.6.4 Erythrozytenzahl	91
7.2.6.2.6.5 Multivariate Prüfungen	92
8. <u>Diskussion</u>	94
8.1 OCAA ₁ -Ferritin	94
8.2 OCAA ₂ -CEA	101
8.3 AFP	108
8.4 OCAA ₃	112
8.5 OCAA ₄	115
8.6 Andere Antigene	117
8.7 Ovarialkarzinom-assoziierte Antigene und monoklonale Antikörper	123
9. <u>Zusammenfassung</u>	130
10. <u>Tabellen</u>	134
11. <u>Abbildungen</u>	161
12. <u>Literaturverzeichnis</u>	200
13. <u>Lebenslauf</u>	221

1. Einleitung

Das Ovarialkarzinom gilt nach dem Zervix- und Corpuskarzinom als das häufigste Genitalkarzinom der Frau (Inzidenzrate 10-15 Erkrankungsfälle/Jahr/100 000 Frauen) und rangiert als Krebstodesursache bei Frauen nach dem Mamma- und Colonkarzinom an dritter Stelle sowie an erster Stelle der Genitalkarzinome mit einer Sterblichkeit von 60-70% bzw. einer Gesamt-5-Jahres-Überlebensrate für den invasiven Tumor von 15-25% (66, 14). Unter Berücksichtigung der verschiedenen Tumorstadien zeigt sich ein deutlicher Anstieg der 5-Jahres-Heilungsraten mit abnehmendem Stadium von 0-2% (Stad. IV) über 10% (Stad. II) für die fortgeschrittene Erkrankung, nach 48% (Stad. II) bzw. 86% (Stad. I) beim frühen Stadium, was die besondere Dringlichkeit einer Frühdiagnose vor Augen führt. Im Gegensatz dazu wirken statistische Erhebungen enttäuschend, nach denen nur 3-4% der diagnostizierten Ovarialkarzinome durch Früherkennungsmaßnahmen sowie 7-8% der Fälle rein zufällig entdeckt wurden, während 80-85% der Fälle erst aufgrund von Symptomen (z.B. Schmerzen im Unterleib, Obstipation, Zunahme des Leibesumfangs, Gewichtsverlust) als Zeichen einer fortgeschrittenen Erkrankung erkannt werden konnten. Dem entspricht auch ein verschwindender Anteil von ungefähr 4% von Fällen im Stadium I bei der Erstdiagnose. Während die meisten Patientinnen im Anfangsstadium überhaupt keine Beschwerden verspüren, klagen wenige über Abgeschlagenheit, Müdigkeit, Inappetenz, unklares Fieber oder Blutungen im Senium (66).

Angesichts dieser ernüchternden Fakten ist neben einer ständigen Verbesserung operativer, chemotherapeutischer und radiologischer Verfahren sowie ihrer Integration in eine kombinierte Behandlung eine Verbesserung der Früherkennungsmöglichkeiten von entscheidender Bedeutung. Dazu gehören Tastbefund, Douglas-Punktion, Exfoliativzytologie, Sonographie, Pelviskopie, CT-Untersuchungen und Laparotomie, deren Nutzen für die Frühdiagnose kontrovers beurteilt wird. Zusätzlich hat man schon lange weitere Informationen in labordiagnostischen Befunden gesucht, wobei neben Veränderungen von Enzymaktivitäten (z.B. LDH, PLAP), Immunglobulinen und akute-Phase-Proteinen (α_1 -saures Glykoprotein, -Antitrypsin, Haptoglobin) und Komplementfaktoren (C 3, C 4) auch sogenannte Tumormarker herangezogen wurden (14, 17, 99). Darunter sind Substanzen von Protein-, Lipid- oder Kohlenhydratcharakter zu verstehen, die als antigenetische Bestandteile in oder auf Tumorzellen vorkommen oder deren Bildung in der Umgebung induziert wird und die oft als zirkulierende Antigene in Körperflüssigkeiten abgegeben werden. Tumormarker korrelieren oft in hohem Maße mit der Entstehung, dem Wachstum und der therapiebedingten Verkleinerung eines Tumors. Sie sind weniger tumorspezifische als tumorassoziierte Antigene, die sich vom Antigenprofil der entsprechenden Normalzellen dadurch unterscheiden, daß sie entweder Neoantigene, biosynthetisch aberrierende Vorstufen normaler Antigene (z.B. Blutgruppensubstanzen und -vorläufer), ektopisch gebildete normale Antigene (z.B. Hormone) oder ontogenetisch alte reaktivierte Antigene (onkofetale Antigene) darstellen.

Ziel der vorliegenden experimentellen Arbeit war die Suche nach zirkulierenden tumor-assoziierten Protein-Antigenen in serösen oder muzinösen Adeno-Keimepitheltumoren des Ovars, der größten Gruppe von Ovarialtumoren, und deren Messung im Serum von Patientinnen mit Ovarialkarzinom mittels einer hochempfindlichen Meßmethode. Dabei sollten folgende Aufgaben sequentiell bearbeitet werden:

1. eine saline und Perchlorsäure-Extraktion von gepoolten Ovarialadenokarzinomen und saline Extraktion von gepoolten normalen Ovarien und Lyophilisation der im Überstand löslichen Proteinbestandteile;
2. eine gelchromatographische Auftrennung der erhaltenen Tumorextrakte zur Herstellung molekulargewichts-einheitlicher Unterfraktionen;
3. eine Immunisierung von Kaninchen mit Tumorgesamextrakten und deren Unterfraktionen;
4. eine immunologische Testung der erhaltenen Antiseren nach Absorption mit Normalserum, Erythrozyten und partiell mit normalem Ovarialgewebsextrakt auf noch nachzuweisende Antikörper gegen Tumorextrakt;
5. bei positivem Nachweis von tumor-assoziierten Antigenen ein Versuch ihrer Charakterisierung, Identifizierung und weiteren Reindarstellung mittels immunaffinitätschromatographischer Methoden unter Verwendung der gereinigten und isolierten Antikörper aus den hergestellten Antiseren;

- 6a. im Falle identifizierbarer Antigene Verwendung evtl. verfügbarer radioimmunologischer Tests oder Herstellung eines solchen zur Messung des Antigens im Serum;
- 6b. im Falle nicht identifizierbarer Antigene Herstellung eines radioimmunologischen Tests zu seiner Bestimmung im Serum;
7. eine Ermittlung von Normalbereichen bzw. oberen Normgrenze für die unter Punkt 6 genannten Radioimmunoassays und Bestimmung der Antigene im Serum eines Kollektivs von Patientinnen mit Ovarialkarzinom verschiedener Stadien;
8. eine statistische Auswertung der erhaltenen Serumbefunde verschiedener Marker-Antigene und ihr Vergleich mit einigen nützlichen Parametern sowie eine Beurteilung der Brauchbarkeit der Marker-Antigene für die Ovarialkarzinom-Diagnose.

2. Einführung

Jede fünfte Frau stirbt an Krebs, jede vierte erkrankt daran. Für jeweils 15 bis 20% der Krebstodesfälle sind die Genitalkarzinome und das Mammakarzinom verantwortlich zu machen (154). Innerhalb des Genitales verteilen sich die Karzinomerkrankungen zu 35% auf die Zervix, zu 25 bis 45% auf das corpus uteri zu 2% auf die Vagina und zu 5% auf die Vulva. Das Ovarialkarzinom liegt mit 20 - 25% an dritter Stelle der malignen Erkrankung des weiblichen Genitales.

Während beim Mamma- und Zervix-Karzinom in den letzten Jahren verschiedene Methoden zur Diagnostik von Frühstadien der malignen Erkrankung (z.B. Mammographie, zytologische Untersuchung von Punktionsmaterial) entwickelt wurden, werden Ovarialkarzinome nach wie vor meist erst in fortgeschrittenen Stadien erkannt. Speziell bei diesen Tumoren gilt die Regel, grundsätzlich jeden als maligne anzusehen, bis das Gegenteil eindeutig bewiesen ist.

65 bis 75% aller Ovarialtumoren sind epitheliale Tumoren. Darunter sind die serösen Zystadenokarzinome am häufigsten und bösartigsten. In die restlichen Prozente teilen sich Tumoren des gonadalen Stromas (ca. 4%), Keimzelltumoren (15%), und bindegewebige Tumoren (5%) (Tab. 1).

3. Gynäkologische Tumoren (59)

3.1 Das Mammakarzinom

In den Ländern der westlichen Welt beträgt der Anteil des Mammakarzinoms an allen weiblichen Krebstodesfällen ca. 25%. Es ist in diesem Verbreiterungsraum damit der bei Frauen häufigste Organkrebs. In Asien liegen die entsprechenden Prozentsätze auffallend niedriger. Für 1971 wurde in Japan die Mortalität an Mammakarzinom mit 5 auf 100 000 Frauen und damit fünfmal geringer als in der Bundesrepublik Deutschland angegeben. Die Wahrscheinlichkeit, an einem Mammakarzinom zu erkranken, nimmt mit dem Lebensalter zu. Vor dem 25. Lebensjahr ist der Tumor selten und dann meist ein Sarkom. Nur in Ausnahmefällen

kommen Mammakarzinome auch beim männlichen Geschlecht vor. Die Entstehung von Mammakarzinomen begünstigende Faktoren sind unterschiedlicher Natur. Einer Risikogruppe zugehörig gelten Frauen, bei denen eine Reihe von der Norm abweichende Merkmale festzustellen sind: Menarche vor dem 12. Lebensjahr, späte Menopause, Kinderlosigkeit, Schwangerschaften vor dem 16. und nach dem 35. Lebensjahr, Nichtstillen, chronisch zystische Mastopathie, Mammakarzinom der kontralateralen Brustdrüse, Langzeit-Östrogenbehandlung und, als genetisch bedingte Komponente, häufigeres Vorkommen bei weiblichen Verwandten.

Unter den Faktoren, die zur Entwicklung eines Mammakarzinoms prädisponieren, werden an erster Stelle hormonale Einflüsse von Östrogenen, Gestagenen und Prolaktin genannt.

Statistisch abgesicherte, von der regionalen Bevölkerungsstruktur (Stadt, Land) und der sozialen Schichtung abhängige Inzidenzunterschiede berechtigen zu der Annahme, daß auch Umweltfaktoren bei der Entstehung des Mammakarzinoms wirksam sind.

Mammakarzinome metastasieren sehr früh in die regionalen Lymphknoten. Nach der Einteilung von SCARFF und BLOOM in drei histologische Malignitätsgrade liegt die Zehn-Jahres-Überlebensrate bei 53% (Grad I), bei 27% (II) und 19% (III).

3.2 Das Collum-Karzinom

Am Collum-Karzinom erkranken weltweit bis zu 35 von 100 000 Frauen. Die Mortalitätsrate liegt bei 10 bis 12 pro 100 000. Regional gibt es kaum Unterschiede. Einen Ausnahmefall bildet die schwarze US-Bevölkerung mit doppelt so hohen Sterbeziffern.

Ätiologisch ist nur bekannt, daß gewisse Verhaltensweisen die Entstehung des Tumors begünstigen. Dazu gehören: Geschlechtsverkehr in früher Jugend, häufiger Partnerwechsel, größere Kinderzahl und nachlässige Genitalhygiene des Partners. Die Malignität nimmt mit höherem Erkrankungsalter zu.

Die leichte Zugänglichkeit des Collum-Karzinoms war für den Erwerb von Erkenntnissen über die Morphogenese des Tumors förderlich. Dies war die Voraussetzung für eine sichere Früherfassung im Massenscreening und eine abgestufte sehr effektive Therapie.

Diese Erfolge der letzten Jahrzehnte werden durch eine Steigerung der 5-Jahres-Überlebensrate auf 60 bis 70% belegt. Beginnt die Therapie bereits im Stadium I, steigt die Überlebensrate auf 85%. Keine Aussicht auf Heilung besteht, wenn ein Tumor des Stadiums IV vorliegt.

3.3 Das Korpuskarzinom

Das Korpuskarzinom hat an den bösartigen Geschwulsterkrankungen der Frau einen Anteil von 10%. Im Bereich des Genitales entfallen 25 bis 45% aller Tumoren auf das corpus uteri. Gefährdet sind vor allem Frauen zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr.

Auffallend ist die Zunahme der Inzidenz in allen Altersgruppen. Das Häufigkeitsverhältnis zum Kollumkarzinom hat sich in den letzten 60 Jahren von 1:17 auf 1:2 geändert. Bei einem Vergleich der Inzidenzraten verschiedener Regionen fallen die niedrigen Erkrankungsziffern in Japan auf.

Eine verstärkte Neigung zum Korpuskarzinom wird bei Frauen mit rhythmusgestörter oder ständiger Östrogenstimulation beobachtet. Als prädisponierende Faktoren gelten verspäteter Eintritt der Menopause, dysfunktionelle Blutungen während der Prämenopause, Kinderlosigkeit, Adipositas, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie und Hypothyreose.

Die höchsten 5-Jahres-Überlebensraten werden bei der operativen Behandlung von Patientinnen im Stadium I erreicht. Die durchschnittliche Überlebensrate aller Stadien (I - IV) zusammengekommen beträgt 65 bis 70%.

3.4 Das Vulva-Karzinom

Das Vulva-Karzinom ist ein Tumor des höheren Lebensalters. Der Erkrankungsgipfel liegt im 7. Lebensjahrzehnt. Der Anteil an allen gynäkologischen Tumoren beträgt 3%.

Eine höhere Inzidenz des Karzinoms ist gegeben bei Vorliegen von Crauroris vulvae und Leukoplakien. Zusammenhänge scheinen auch zu bestehen zum Diabetes mellitus, der in 40% aller Erkrankungsfälle vorliegt.

Die Angaben zur 5-Jahres-Überlebensquote schwanken zwischen 50 und 70%. Jüngere Patientinnen ohne Kontraindikationen für eine Radikaloperation haben eine günstigere Prognose.

3.5 Das Vaginal-Karzinom

Mit einem Anteil von 1 bis 3% ist das Vaginal-Karzinom der seltenste Vaginaltumor. Es tritt meist im Alter zwischen 55 und 60 Jahren auf, kommt aber in selteneren Fällen im Kindes- und Säuglingsalter vor.

Der Tumor sitzt meist im hinteren oberen Scheidendrittel. Diese Lokalisation und die Tatsache, daß in der Mehrzahl ältere und multipare Frauen betroffen sind, macht die Annahme einer starken mechanischen Belastung dieses Scheidenteils als auslösenden Faktor wahrscheinlich. Auch das Auftreten dieses Tumors bei langjähriger Pessarbenutzung und Uterusprolaps sprechen für diese Hypothese. In jüngerer Zeit wird auch eine Korrelation zwischen Vaginalkarzinom und Diäthylstilboestrol-Behandlung während der Schwangerschaft vermutet.

Da dieser Tumor wegen der unspezifischen, meist nicht mit Schmerzen einhergehende Symptomatik in der Regel spät diagnostiziert wird, kommt die Therapie erst fortgeschritteneren Stadien zugute. Hierbei verspricht eine Strahlenbehandlung den größten, eine Chemotherapie den geringsten Erfolg. Die durchschnittliche 5-Jahres-Heilungsrate liegt bei 35%; unter optimalen Verhältnissen ist eine Quote von 70% erreichbar.

3.6 Das Chorionepitheliom

Die Inzidenz des Chorionepitheliom weist große regionale Unterschiede auf. In Europa und Nordamerika ist es mit einer einzigen Erkrankung auf 100 000 Schwangerschaften der seltenste Genitaltumor. Bis zu 200mal größer ist diese Rate in Asien. Beim Chorionepitheliom handelt es sich um infiltrierend wachsendes Placentargewebe, bestehend aus den großen Zellen des Zytotrophoblasten und einem vielkernigen Synzytium. Die Erkrankung wird in 50% aller Fälle durch eine Blasenmole ausgelöst, in 25% durch einen Abort und tritt in 20% bei normaler Schwangerschaft auf. Ektopische Trophoblasten können an der Tumorbildung beteiligt sein.

In der Therapie hat sich beim Chorionepitheliom die zytostatische Chemotherapie als Verfahren der Wahl durchgesetzt. Es werden Heilungsquoten erzielt, die bei über 70% liegen.

4. Das Ovarialkarzinom (59)

4.1 Epidemiologie

Das Ovarialkarzinom hat an den malignen Genitaltumoren der Frau einen Anteil von 20 bis 25%. In seiner Häufigkeit steht es nach dem Zervix-Karzinom (35%) und dem Korpuskarzinom (25 - 45%) an dritter Stelle.

Krebsstatistiken deuten darauf hin, daß das Ovarialkarzinom seine größte Verbreitung in hochindustrialisierten Ländern hat. Für Europa und Nordamerika werden drei- bis viermal höhere Inzidenzen als für Afrika und Asien angegeben. Die primäre

durchaus naheliegende Schlußfolgerung, daß Umweltfaktoren für die Genese dieses Tumors mitverantwortlich sein könnten, verliert jedoch durch die auffallend geringe Inzidenz dieses Tumors in Japan an Wahrscheinlichkeit. Ungeklärt bzw. widersprüchlich ist das Phänomen, daß die Anfälligkeit von in den USA ausgewanderten Japanerinnen deutlich zunimmt. In den letzten 20 Jahren wurde eine ständig ansteigende Mortalitätsrate registriert. Nach YOUNG und de VITA hat sich seit 1935 die Sterblichkeit am Ovarialkarzinom verdreifacht. In der Mortalitätsstatistik liegt die Bundesrepublik Deutschland mit 17 pro 100 000 an der Spitze vor Schweden (14 pro 100 000) und den USA (11 pro 100 000). Für Japan lautet die Ziffer 3 pro 100 000.

4.2 Ätiologie

Über eine Prädisposition ist wenig bekannt. Patientinnen mit Ovarialkarzinom unterscheiden sich nicht von Patientinnen mit anderen gynäkologischen Tumor-Erkrankungen. Zusammenhänge mit Störungen des Menstruationszyklus, früherer Einnahme von Hormonpräparaten, Menarche- und Menopausen-Alter, Nulliparität, der Zahl von Geburten und Fehlgeburten, früherer Strahlenbelastung, Blutgruppenverteilung, familiärer Krebsdisposition oder Nikotinkonsum sind nicht gesichert.

Gehäuft treten Karzinome im dysontogenetischen Ovar auf. Die Aussagekraft dieses Befundes ist jedoch angesichts der Seltenheit solcher Mißbildungen gering.

Es ist nicht auszuschließen, daß Karzinome durch Verlagerung des Müller'schen Keimepithels in die Tiefe des Ovarialstromas entstehen. Als auslösender Faktor wird eine endogene Dysregulation diskutiert. Der Beweis steht allerdings noch aus.

4.3 Histologie

Nach ihrer Histogenese werden Ovarialtumoren in drei Gruppen eingeteilt. Entstehungsorte sind das Müller'sche Keimepithel, die pluripotenten Keimzellen und das Ovarialstroma.

Fast zwei Drittel aller Ovarialtumoren sind vom Oberflächen-(Keim-)epithel ableitbar. Nach den Differenzierungsformen dieses Epithels werden ein Typ 1 (papillär-serös), Typ 2 (muzinös), Typ 3 (endometroid) und Typ 4 (unklassifizierbares Karzinom) unterschieden. Jedem dieser Typen werden noch die Unterscheidungsmerkmale "gutartig" oder "proliferierend" (=präkanzerös borderline) oder "Karzinom" zugeordnet. Tumoren des Müller'schen Keimepithels haben mit einem Anteil von 25% die höchste Malignitätsrate. Die zweithäufigste Gruppe bilden die Tumoren der Keimzellen. Hier treten die gutartigen Dermoidzysten, die ihren Altersgipfel zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr haben, am häufigsten auf.

Zu den Tumoren des Ovarialstromas werden neben den sogenannten funktionellen Zysten (große Follikelzysten und Korpus-Luteum-Zysten), auch Granulosa- und Thekazelltumoren, Arrhenoblastome und Sarkome gezählt. Eine maligne Entartung wird hier mit ca. 15% angegeben. Kein typisches, aber ein doch häufig auf-

tretendes Merkmal dieser Tumoren ist ihre Hormonaktivität.

Ein Viertel der im Ovar gefundenen Tumoren sind Metastasen anderer Primärtumoren, vor allem von Karzinomen des Endometriums, der Brustdrüse, des Darms (vor allem Sigmoid) und des Magens. Die Metastasen-Implantation in die Ovarien findet bevorzugt im geschlechtsreifen Alter statt, da die mit Follikelreifung und Follikelsprung einhergehende Hyperaemie die Ansiedlung von Krebszellen begünstigt.

4.4 Ausbreitung und Metastasierung

Man findet bei allen Typen der Ovarialtumoren sowohl eine Ausbreitung durch direkte Invasion in die Leibeshöhle als auch eine lymphogene und hämatogene Metastasierung. Entsprechend dem Lymphabfluß aus den Ovarien finden sich Absiedlungen von Krebszellen primär in den paraaortalen und sekundär in den mediastinalen und iliakalen Lymphknoten. Die Tendenz zu extrem früher lymphogener und hämatogener Ausbreitung erklärt den hohen Malignitätsgrad der Erkrankung.

4.5 Diagnostik

Die Symptomatik bei Ovarialtumoren ist uncharakteristisch; die Diagnose kann klinisch nicht immer eindeutig gestellt werden. Das Beschwerdebild wird von den lokalen Erscheinungen oder auch von Allgemeinveränderungen geprägt. Eine große Tumormasse kann eine Zunahme des Leibesumfangs, ein Fremdkörpergefühl oder Beschwerden durch Verdrängung von Nachbarorganen auslösen.

Abhängig von der Beweglichkeit des Tumors sind uncharakteristische Schmerzen, Peritonealreize und Stieldrehungserscheinungen mit den Zeichen eines akuten Abdomens zu beobachten. Auch die Lage des Tumors ist häufig für die Symptomatik entscheidend. Ein Tumor vor dem Uterus wird in der Regel Blasenbeschwerden verursachen. Ein im Douglas gelegener Tumor dagegen kann zu Defäkationsstörungen und Kreuzschmerzen führen. Bei intraligamentärer Lage kommt es zur Verdrängung von Harnleiter und Uterus einhergehend mit Harnstauung, Fremdkörpergefühl und Schmerzen. Störungen der Tumurvitalität können Verwachsungen mit Nachbarorganen und entsprechende sekundäre Beschwerden zur Folge haben.

Zystische Ovarialtumoren zeigen bei spontanen oder iatrogenen Rupturen (nach Palpation) das Bild eines akuten Abdomens. Bei jeder pathologischen Östrogenaktivität in Kindheit und Jugend (Pubertas praecox, juvenile Makromastie), wie auch bei jedem androgenen Effekt im Erwachsenenalter (plötzliche Virilisierungserscheinungen) muß an einen hormonaktiven Ovarialtumor gedacht werden.

Ein Aszites kann durch eine Peritonealkarzinose, aber auch durch einen gutartigen Ovarialtumor (Meigs-Syndrom: Ovarialfibrom, Aszites, Pleuraerguß) bedingt sein.

Liegt bereits eine hämatogene Metastasierung vor, können Knochenschmerzen oder Lungensymptome Hinweise auf ein Ovarialkarzinom geben.

Eine Kachexie findet sich nicht nur bei Karzinomen, sondern auch bei großen eiweißspeichernden benignen Tumoren.

Die abgestufte Diagnostik bei Verdacht auf einen Ovarialtumor besteht in: Inspektion, Palpation, Perkussion, Schwangerschaftstest, Ultraschall, Computertomogramm, Kolon-Kontrast-Einlauf, i.v.-Pyelogramm, Punktion und Laparoskopie. Bei jedem Nachweis eines Ovarialtumors sollte laparotomiert werden.

4.6 Stadieneinteilung

Um die Tumorausdehnung zu bestimmen (Staging), werden z.Zt. zwei gering voneinander abweichende Schemata benutzt: die Stadieneinteilung der FIGO (International Federation of Gynecology) von 1965 und die TNM-Klassifizierung von 1966 (Tab. 2). Bei beiden handelt es sich um postoperative Einteilungen.

4.7 Allgemeine Therapieprinzipien

Dignität der Geschwulst und lokale Tumorausdehnung entscheiden über die Operabilität bzw. über die Ausdehnung des operativen Eingriffs. (Abb. 1)

4.7.1 Sicher gutartige Tumoren

werden exstirpiert. Dabei kann die Erhaltung eines Ovarrestes bei Patientinnen im gebärfähigen Alter angezeigt sein.

4.7.2 Sicher maligne Tumoren

verlangen die Exstirpation des Uterus und beider Adnexen, weil Ovarialtumoren zu bilateraler Manifestation neigen (in bis zu 50% aller Fälle). Zusätzlich sind alle metastasenverdächtigen Bezirke anderer Lokalisation zu entfernen.

4.7.3 Fraglich maligne Tumoren

werden zunächst schonend exstirpiert. Über die Weiterbehandlung entweder nach 4.7.1 oder 4.7.2, entscheidet der histologische Befund des Pathologen. Wegen der Häufigkeit von Ovarialmetastasen sollte bei der klinischen Diagnose "Ovarialkarzinom" stets ein extragenitaler Primärtumor (Mamma, Intestinaltrakt) ausgeschlossen werden.

4.8 Spezielle Therapie maligner Ovarialtumoren

4.8.1 Operable Tumoren

Bei günstig gelagerten Fällen ist die Operation die Methode der Wahl und erstreckt sich auf Uterus, beide Adnexen und das große Netz.

Die schlechte Zugänglichkeit der paraaortalen Lymphknoten und die während der Operation möglicherweise erfolgte Tumorzell-dissemination vor allem aber die unsichere Prognose des Ovarialkarzinoms überhaupt (frühzeitige hämatogene Metastasierung), machen eine perioperative internistisch-onkologische bzw. radiologische Behandlung zur dringenden Forderung.

Drei Methoden stehen zur Wahl:

1. die "prophylaktische" perkutane Bestrahlung,
2. die intraperitoneale Applikation von Radiogold oder einem Zytostatikum und
3. die prophylaktische Gabe von Zytostatika.

Beim Verdacht auf Metastasierung wird die zytostatische Therapie für ein halbes bis zu einem Jahr durchgeführt.

4.8.2 Inoperable Tumoren

Hier bieten sich zwei Therapiewege an:

Entweder, nach Feststellung der lokalen Inoperabilität, lediglich die genaue Registrierung der Tumorausbreitung und Gewebsentnahme zur histologischen Untersuchung oder die Entfernung von soviel Karzinomgewebe wie möglich, um der Weiterbehandlung günstigere Voraussetzungen zu schaffen.

Angestrebt wird dabei:

1. das Eindämmen des Tumorwachstums durch systemische Gabe von Zytostatika, eine kurative Perkutanbestrahlung oder intraperitoneale Applikation von Zytostatika oder Radioisotopen,
2. die Verbesserung des Allgemeinzustandes kachektischer Patientinnen durch Gabe von Anabolika,
3. eine Hemmung der Aszitesbildung durch Diuretika-Gaben, verbunden mit Aszitespunktion, wenn die angesammelte Flüssigkeit Dyspnoe oder abdominale Spannungsschmerzen verursacht.

4.9 Prognose

Das Kollektiv der malignen Ovarialtumoren ist ausserordentlich heterogen. Gut- und Bösartigkeit lassen sich histologisch oft nicht eindeutig abgrenzen. Die Möglichkeiten einer eindeutigen Aussage über Heilungs- und Überlebenschancen bei malignen Ovarialtumoren sind deshalb beschränkt.

Neben der Histologie hat das Tumorstadium die größte prognostische Bedeutung. So finden sich heute im südwestdeutschen Einzugsgebiet großer Kliniken 11,5% Stadium I-, 24,7% Stadium II-, 46,5% Stadium III- und 12,9% Stadium IV-Fälle. Bei den restlichen 5,4% muß allein aufgrund des klinischen Bildes ein Ovarialkarzinom angenommen werden, ohne daß eine Sicherung der Diagnose durch Laparotomie oder Gewebsentnahme möglich gewesen wäre. Unter Behandlung erreichen heute 82% der Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom im Stadium I eine Drei-Jahres-Heilung.

Schon im Stadium II sinkt der Anteil der Patientinnen mit einer postoperativen Lebenserwartung von 5 Jahren auf 46% ab.

Im Stadium III sind es trotz gezielter chirurgischer, Strahlen- und zytostatischer Therapie nur noch 5%, die 5 Jahre überleben.

Im Stadium IV ist eine Fünf-Jahres-Heilung auf Einzelfälle beschränkt.

Wie schon erwähnt, ist die Überlebenszeit auch von dem histologischen Befund abhängig. So zeigen Patientinnen mit muzinöser Malignomen 62%, endometroiden 55%, serösen 15% und unklassifizierbaren 20% Fünf-Jahres-Überlebenszeiten.

5. Allgemeine Tumorantigene

5.1 Das karzinoembryonale Antigen (CEA)

Das CEA wurde 1965 von GOLD und FREEDMAN (72) im Adenokarzinom des Kolons als tumor- und organspezifisches Protein beschrieben. COLLINS und BLACK (51) bezeichneten CEA als ein verstecktes Oberflächenantigen, das normalerweise im Erwachsenenengewebe nicht exponiert vorkommt. Unter dem Elektronenmikroskop läßt sich CEA auf der Oberfläche von malignen Schleimhautzellen nachweisen. BURTIN et al. (40) entdeckten CEA nicht nur in malignen Tumoren, sondern auch in normaler Kolonschleimhaut von Kindern im ersten Lebensjahr. Durch indirekte Immunfluoreszenz konnten BORDES et al. (35) CEA nicht nur in Tumoren des Verdauungstraktes, sondern auch in extragastrointestinalen Tumoren und benignen colorektalen Polypen nachweisen. Anhand einer groß angelegten Studie wiesen KHOO et al. (94) CEA und CEA-ähnliche Aktivität in Perchlorsäure-Extrakten folgender Gewebe nach: höchste Konzentrationen (größer 200 ng/g Gewebe) bei Tumoren des Gastrointestinaltraktes, der Leber und Lunge, niedrigere Konzentrationen beim squamösen Zellkarzinom, Hepatom und Cholangiokarzinom sowie bei Uterus-, Ovarial-, Nieren- und Nebennierentumoren und die niedrigsten Konzentrationen bei Prostata- und Urothelialekarzinomen.

5.1.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften

CEA ist ein Glykoprotein, das in der Elektrophorese in der Beta-Fraktion wandert. Sein Molekulargewicht liegt zwischen 150 000 und 200 000 D.. Es ist enzyminaktiv und relativ hitzestabil. Der Kohlehydratanteil beträgt 50 bis 75%, sein Hexosegehalt 25% und sein Proteingehalt 25 - 50%. Sein isoelektrischer Punkt wird mit 4,8 angegeben.

Die Isolierung von CEA wird meistens nach der Methode von GOLD und FREEDMAN (72) mit einer Perchlorsäure-Extraktion vorgenommen. Der große Vorteil dieser Methode liegt in der Aggressivität der Perchlorsäure gegen die meisten Serumproteine, die im weiteren Untersuchungsgang störend wirken würden. Durch Gelfiltration und Affinitäts-Chromatographie kann man so reinste Fraktionen von CEA und durch Immunisierung von Tieren mit diesen Präparationen potente Anti-CEA-Seren erhalten.

Als bedeutendstes mit CEA kreuzreagierendes Antigen wurde von BURTIN et al. (41) ein aus normaler Kolon-Schleimhaut extrahiertes Antigen beschrieben und als unspezifisches kreuzreagierendes Antigen (NCA = nonspecific crossreacting antigen) benannt. Es ist ein Glykoprotein, das auch in normalem Lungen- und Milzgewebe sowie im Serum vorkommt. Es ist wie CEA ein Beta-Globulin, das mit ihm eine weder organ- noch tumorspezifische Antigendeterminante teilt.

5.1.2 Klinik

Zur Bestimmung der teils sehr niedrigen Serumkonzentration und Abgrenzung zu Normalwerten hat sich für Screening- und Verlaufsuntersuchungen der Radioimmunoassay (RIA) und Enzymimmunoassay gegenüber anderen immunologischen Tests durchgesetzt.

In erster Linie hat die Serum-CEA-Konzentrations-Bestimmung bei Verdacht auf Kolon-, Rektum-, Pankreas- und Lungenkarzinom in der Klinik Bedeutung erlangt.

In Tab. 4 sind die wichtigsten klinischen Parameter aufgeführt, wobei die größte Bedeutung der Serum-CEA-Verlaufskontrolle bei bekannter Tumordiagnose (praeop., postop., unter Chemo- bzw. Radiotherapie) zukommt.

5.2 Das Alpha-Fetoprotein (AFP)

Zum ersten Mal wurde AFP 1963 von ABELEV und Mitarbeitern (1) im fetalen menschlichen Serum nachgewiesen. Es ist ein α_1 -Glykoproteid (MG von ca. 65 000 D.) AFP erreicht höchste Serumkonzentrationen bei den meisten Säugetieren (62), so auch beim Menschen, in der Fetalzeit. Beim gesunden Erwachsenen ist es nicht mehr oder nur in geringen Konzentrationen nachzuweisen. Als Bildungsorte des AFP sind der Dottersack, die fetale Leber und der fetale Gastrointestinaltrakt anzusehen. Seine Bedeutung ist noch unklar, möglicherweise spielt es eine Rolle als Schutzfaktor gegen mütterliches Östrogen.

1971 gelang HIRAI und NISHI (85) und LEHMANN et al. (117) die Reindarstellung von AFP. Der erste präparatorische Schritt bestand in einer Anreicherung aus Gewebe und Körperflüssigkeiten, wie Plasma, Serum und Ascites durch Hitzefällung. Mit verschiedenen chemischen Fällungsmethoden, z.B. mit Ammoniumsulfat in 34%iger oder 64%iger Lösung und durch Säulenchromatographie-Auftrennung (z.B. Gelfiltration, DEAE-Cellulose, CN-Bromid aktivierte Sepharose 4 B) wurden Substanzausbeute und Reinheitsgrad gesteigert.

5.2.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften

(die physikalisch-chemischen Eigenschaften des AFP sind weitgehend bekannt):

AFP ist ein α_1 -Glykoprotein mit einem Molekulargewicht zwischen 61 000 und 75 000 und einem Sedimentationskoeffizienten zwischen 4,5 und 5,5 S.

Der Kohlehydratgehalt wird mit 3 bis 4,3% angegeben. Aminosäure-Analysen von Hepatom- und fetalem AFP zeigten nahezu Übereinstimmung. ABELEV et al. (1) wiesen auf eine physikalisch-chemische Ähnlichkeit von AFP und Albumin hin. AFP kann nach Untersuchungen mit Ratten-AFP auch Östrogene, nicht aber Testosteron oder Progesteron binden. Auf die mögliche Bedeutung des AFP als Östrogenschutzfaktor für den Feten wurde bereits hingewiesen (162).

5.2.2 Klinik

Zum AFP-Nachweis im Serum von Tumorpatienten wurden die zweidimensionale Doppeldiffusion (Ouchterlony), die Fluorelektroimmunodiffusion, die Elektroimmunodiffusion, ein enzybindender Immunoassay und der Radioimmunoassay (RIA) beschrieben. Aufgrund der niedrigen Normalserumkonzentrationen von AFP eignet sich der RIA mit einer Empfindlichkeit von 2,5 - 0,25 ng/ml am besten für Screening- und Verlaufsstudien. Die am häufigsten verwendete Testmethode arbeitet nach der Doppelantikörpertechnik mit Anti-AFP-Serum vom Schaf oder Kaninchen und Anti-Schaf- oder -Kaninchen-Immunglobulin von Kaninchen bzw. der Ziege.

Klinische Bedeutung erreichte AFP bei Screening-Untersuchungen von an primärem Leberzellkarzinom-Erkrankten. ⁽⁶⁾ Mit der zweidimensionalen Doppeldiffusion wurden bei dieser Erkrankung erhöhte AFP-Konzentrationen bei 40 bis 70%, mit der Elektroimmunodiffusion bis 80% der Fälle gefunden. Eine Erhöhung in ca. 95% dieser Fälle zeigte sich bei Verwendung der passiven Hämagglutination und dem RIA.

Weitere Tumoren, bei denen die AFP-Bestimmung hohe Positivitätsraten zeigt, sind das Teratom und das Teratoblastom (Hoden, Ovar und extragonadal). Eine klinisch wichtige Rolle spielt dies zur Unterscheidung von Seminomen und Dysgerminomen, die ausnahmslos Normalwerte zeigen.

An nichtmalignen Erkrankungen, die mit einer vorübergehenden Erhöhung des Serum-AFP-Spiegels einhergehen können, sind die akute Virushepatitis, sämtliche chronisch degenerativen Lebererkrankungen (Alkohol-, Drogen-, biliäre Leberzirrhose), Gallengangsläsionen, Verschlußikterus, Hämochromatose und Ataxia teleangiectasia zu nennen. Während der Schwangerschaft sind vor allem bei fetalen Mißbildungen (Neuralrohrdefekte), fetal distress und fetalem Tod in utero erhöhte AFP-Werte in Serum und Fruchtwasser in Abhängigkeit von der Schwangerschaftswoche nachweisbar: Serum-Normal-Werte liegen im ersten Trimenon zwischen 40 bzw. 120 ng/ml, im zweiten Trimenon bis 360 ng/ml und im dritten Trimenon bis 550 ng/ml; (Fruchtwassernormalwerte 16. - 20. Schwangerschaftswoche bis max. 35 000 ng/ml). (111)

5.3 Ferritin

Der Pharmakologe SCHMIEDEBERG (153) beschrieb 1894 eine Proteinsubstanz, die zu 60% Eisen und in variabler Menge Phosphor enthielt. Er nannte sie Ferratin.

1937 gelang LAUFBERGER (116) die Isolierung und Kristallisation einer Substanz aus der Pferdemicke, die er in Anlehnung an das Ferratin als Ferritin bezeichnete. Bei der Analyse fand sich ein Anteil von 20% Eisen, 9,9% Stickstoff und 9% Phosphor. ROTHEN (147) bestimmte 1944 durch Sedimentationsuntersuchungen das Molekulargewicht von Apoferritin mit 465 000.

Im Anfang waren nur qualitative Serumuntersuchungen möglich.

1950 untersuchten MAZUR et al. (123) Patienten im Schock, mit Leberzirrhose und Herzinsuffizienz. REIßMANN et al. (144) stellten 1956 weitere Untersuchungen an Patienten mit akuter Leberzellnekrose, Morbus Hodgkin und akuter Virushepatitis an. Die ersten quantitativen Serumuntersuchungen mit Hilfe eines immunoradiometrischen Assays unternahmen 1972 ADDISON et al. (3).

5.3.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften

Zur Aufklärung der Molekularstruktur wurde anfänglich Ferritin aus Pferdemicen untersucht. Hierbei ergab sich, daß Holo-ferritin aus einer Hülle von Proteinuntereinheiten (gleich Apoferritin) besteht, die eine Micelle aus Eisen-III-Hydroxyphosphat umgibt. Das native Ferritin weist einen Eisengehalt zwischen Null und einem geschätzten Maximum von 4300 Atomen/Molekül auf. Durch ein Reduktionsmittel läßt sich Eisen abspalten. In Gegenwart eines Chelatbildners wird dieser Vorgang erleichtert.

Aus Lösungen nativen Ferritins kann man Apoferritin durch Zentrifugation in einem isopyknischen Dichtegradienten herstellen oder aus einer 5%igen CdSO_4 -Lösung kristallisieren. Das Apoferritin hat ein Molekulargewicht von ca. 445 000 und besteht höchstwahrscheinlich aus 24 Untereinheiten mit je einem Molekulargewicht von 18 500.

Das Molekulargewicht des Holo-ferritins schwankt entsprechend dem Fe-Gehalt der Micelle bis zum zweifachen des Molekulargewichts des Apoferritins.

DRYSDALE et al. (61) stellten nach Untersuchungen mit Untereinheiten von Ferritin in Harnsäure oder SDS die Hypothese auf, daß lediglich zwei Untereinheiten mit gering unterschiedlichem isoelektrischen Punkt (pI) und Molekulargewicht existieren: die H-Typ-Untereinheit (MG 21000 D), die in mehr sauren Isoferritinen (Herz, Niere, Pankreas, Placenta, HeLa-Zellen) und die L-Typ-Untereinheit (Molekulargewicht 19 000D), die in mehr basischen Isoferritinen (Leber, Milz) vorkommt. Stellt man eine Mischung der bekannten Isoferritine her, so lassen sie sich alle in die oben beschriebenen H- und L-Typen ordnen. Zusätzlich können einige Isoferritine, vor allem Serumferritine, eine Glykosidbindung eingehen und an Concavalin A gebunden werden. Untersuchungen an unterschiedlichen Organen mehrerer Spezies ergaben eine Vielzahl von Ferritinmolekülen mit deutlich voneinander abweichenden Untereinheiten.(79)

Man fand bei der Auftrennung in der Polyacrylamid-Elektrophorese für Human-, Pferde-, Ratten- und Kaninchenferritin Untereinheiten mit einem Molekulargewicht zwischen 11 000 und 8 000. Mit dem immunoradiometrischen Assay (Irma) war es möglich, auch in Erythrozyten und Leukozyten (polymorphkernige Lymphozyten, Monozyten) Ferritin nachzuweisen.

In humanem Leber-, Herz-, Milz-, Pankreas- und Nierengewebe wiesen POWELL et al. (142) fünf verschiedene Ferritine mittels isoelektrischer Fokussierung nach. Es konnte bei allen fünf Gewebesferritinen eine gemeinsame Antigendeterminante gefunden werden. Im Lebergewebe wurde eine zusätzliche Antigendeterminante nachgewiesen, die den übrigen Ferritinformen fehlte.

Ferritin findet sich im Organismus ubiquitär und stellt ein Eisenspeicherprotein dar. Normalwerte im Gewebe wurden mit 40 - 600 µg/g, im Serum mit 60 - 150 ng/ml angegeben. Intrazellulär ist Ferritin diffus im Zytoplasma verteilt. Ein Teil ist auch membranständig am endoplasmatischen Retikulum nachweisbar. In dieser Lokalisation spielt Ferritin eine wesentliche Rolle bei der Eisenaufnahme, wie z.B. bei der Eisen-Pinocytose der Hepatocyten. Nach Einbau in eisenarmes Ferritin wird das Eisen schlußendlich als eisenreiches Ferritin wieder ins Zytoplasma abgegeben. Durch einen zytoplasmatischen Kontrollmechanismus wird die Synthese von Eisen reguliert. Eisen soll dabei die Überführung von reprimierter Ferritin-mRNS in eine transferierbare, nicht reprimierte Ferritin-mRNS-Form induzieren. So steht also bei erhöhtem Eisenangebot mehr transferierbare Ferritin-mRNS zur Synthese von Ferritin zur Verfügung. Ferritin stellt auch ein Depotprotein für überschüssiges Eisen dar, welches in Milz, Leber und Knochenmark angereichert wird und bei Bedarf mobilisiert werden kann. (175)

Ferritin und Hämosiderin enthalten 30% des Gesamtkörpereisens beim Erwachsenen.

Findet eine Eisenzufuhr statt, wird 40 bis 50% davon in der Leber abgelagert, 25 bis 70% davon als Ferritin.

Erst durch die Entwicklung eines empfindlichen immunoradiometrischen Assays gelang der Ferritin-Nachweis im Serum von gesunden Probanden (Normalgrenze liegt bei 200 - 250 ng/ml). Eine direkte Korrelation zeigte sich (bei Vergleich von Serum

und Knochenmark) zwischen Serumferritinspiegel und dem Gehalt an Depoteisen.

5.3.2 Klinik

Entsprechend der Korrelation zwischen Serumferritinspiegel und Depoteisen finden sich bei allen Erkrankungen, die mit einem Eisenmangel einhergehen (z.B. Eisenmangelanämie), auch erniedrigte Ferritinspiegel.

Signifikante Erhöhungen des Serumferritinspiegels werden folgerichtig bei Eisenüberbelastung (z.B. idiopathische Hämochromatose, Hämosiderose), unter Eisentherapie, nach häufigen Transfusionen, bei aplastischer Anämien und Thalassämie gemessen. Außerdem fand man bei Hepatitis, Leberzirrhose, Infektionen und Myocardinfarkt erhöhte Ferritinspiegel.

In letzter Zeit ergaben sich Anhaltspunkte für einen Zusammenhang zwischen erhöhtem Serumferritinspiegel und Krebserkrankungen (Tab. 5).

MARCUS et al. (122) erklären sich die Erhöhung des Serumferritinspiegels durch einen erhöhten Eiseneinbau in das retikuloendotheliale System, hervorgerufen durch abgeschwächte Erythropoese, Entzündungsreaktionen und Nekrosen im Tumor.

Dies konnte bei Leukämie und Morbus Hodgkin nachgewiesen werden. Bei akuter myeloischer Leukämie (AML) konnte bei 60 bis 93% der Fälle, bei akuter lymphatischer Leukämie (ALL) in 41 bis 100% eine Erhöhung des Serumferritins nachgewiesen werden.

Von KEW et al. (93) wurden beim primären Leberzellkarzinom Erhöhungen in 76% der Fälle gefunden. Eine Korrelation zum Lebereisendepot, zur Tumorgröße und zur Transaminasenaktivität

bestand nicht. Bei gleichzeitiger Leberzirrhose fand sich eine negative Korrelation zur AFP-Serum-Konzentration. Untersuchungen an Tumorextrakten erbrachten den Nachweis von Isoferritinen vom sauren Typ.

WAHREN et al. (174) berichteten über Erhöhungen des Serumferritinspiegels bei Patienten mit Keimzelltumoren des Hodens. ISHITANI et al. (89) fanden bei 62% von 34 Patienten mit Lungenkarzinom erhöhte Serumferritinspiegel, wobei sich keine Korrelation zum Stadium der Erkrankung, aber zur Prognose ergab. Erhöhte Serumferritinspiegel fanden sich ausserdem bei Patienten mit Pankreaskarzinom (73 - 75%), mit Karzinomen des Gastrointestinaltraktes (19 - 42%) und des Urogenitaltraktes (16%) sowie mit Neuroblastom (41%).

Die klinisch wichtigsten Erkrankungen mit den höchsten Positivitätsraten an pathologischen Serumferritinspiegeln sind neben den Eisenmangel- und Eisenüberladungserkrankungen bestimmte Leukämieformen, Hepatome, das Mamma- und das Bronchialkarzinom.

5.4 Weitere Antigene

Ein von BUFFE et al. 1968 (38) in der fetalen Leber gefundenes alpha-2-H-Protein genanntes Antigen zeigte erhöhte Serumspiegel bei Patienten mit Hepatom. Inzwischen ist erwiesen, daß es sich hier um ein Isoferritin handelt.

Das beta-onkofetale Antigen (BOFA) wurde erstmals von FRITSCHKE und MACH (68) 1975 beschrieben. Bei Gewebsuntersuchungen fanden GOLDENBERG et al. 1978 (73) hohe Werte im Cervixkarzi-

nom, aber auch in Niere und Leber von gesunden Erwachsenen und Feten. Das Regan-Isoenzym der alkalischen Phosphatase (= karzinoplazentale alkalische Phosphatase) wurde von FISHMAN (67) bei einem Patienten mit Bronchialkarzinom beschrieben. TROUILLAS (172) nannte ein in Glioblastomen und Astrozytomen fetaler Hirnmakromoleküle gefundenes Protein karzinofetales Glia-Antigen (CFGA).

EDYNAK et al. (65) isolierten aus salinen Tumorextrakten (vor allem Magen-, Darmtrakt-, Mamma-, Urogenital- und Lungen-Tumoren) ein Antigen, das sie Gammafetoprotein nannten.

HÄKKINEN (81) beschrieb ein fetales Sulfoglyko-Protein, das normalerweise neun Monate nach der Geburt nicht mehr nachzuweisen ist. Magensaftuntersuchungen belegten ein gehäuftes Wiederauftreten dieses Proteins bei Magenkarzinom-Patienten. BANWO et al. (11) beschrieben 1974 ein onkofetales Antigen im Serum von Patienten mit Pankreaskarzinom (OPA = oncofetal pancreatic antigen).

Alle hier beschriebenen Antigene haben bis heute noch keine klinische Bedeutung erlangt.

6. Fremduntersuchungen - Antigene bei gynäkologischen Tumoren

6.1 Gewebsuntersuchungen

6.1.1 CEA

In einem Perchlorsäureextrakt (PCA) von Ovarialkarzinomen und seinen chromatographierten Fraktionen wiesen KNAUF et al. (104) ein Antigen (OCA) nach, das bei der Untersuchung mit Hilfe der Doppeldiffusionstechnik eine AG-AK-Reaktion mit Anti-CEA-Serum vom Kaninchen zeigte.

IMAMURA et al. (88) stellten PCA-Extrakte von verschiedenen malignen Tumoren einschließlich Ovarialtumoren her und fanden bei der Adsorption von Tumorextrakt mit Kaninchenimmunsereen sechs nicht mit Normalgewebe und Serumproteinen reagierende Antigene. Eines davon (OVC-4) erwies sich bei weiterer Untersuchung als CEA.

TATARINOV et al. (171) wiesen CEA in drei von 17 Adenokarzinomextrakten und in sieben von acht Pseudomuzinkystomen des Ovars nach.

WAHLSTRÖM et al. (173) machten eine Vergleichsstudie mit endozervikalen und endometrialen Adenokarzinomen. Mit Hilfe der Immunperoxidase-Färbung konnten sie CEA in 131 von 163 endozervikalen Tumorgewebsproben (80%) nachweisen. Nur 11 von 137 endometrialen Tumorgewebsproben (8%) waren positiv.

(Nachweisgrenze der Methode bei 3 - 5 ng/g).

Keine Anfärbung zeigten menschliche buffy coat cells und normale endozervikale oder endometriale Gewebsproben.

HEALD et al. (82) untersuchten formalin-fixierte und paraffin-eingebettete Gewebe von 82 epithelialen Ovarialtumoren mit der Immunperoxidase-Technik auf CEA. Sie fanden keine signifikanten Unterschiede in der CEA-Inzidenz unter den verschiedenen histologischen Tumortypen. Lediglich seröse Tumoren wiesen eine geringere CEA-Konzentration auf als muzinöse. Intestinale und nichtintestinale Tumoren enthielten gleiche Mengen von CEA. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen Malignitätsgrad des Tumors und der CEA-Konzentration im Tumorgewebe besteht nicht, z.B. manche borderline-Tumoren haben die gleiche CEA-Konzentration wie sicher maligne. Bezüglich der Gruppe der serösen Tumoren läßt sich folgende Aussage machen, der ein hoher Grad an Wahrscheinlichkeit zukommt: Enthält ein Tumor CEA, dann ist er maligne. Enthält er kein CEA, ist er nicht zwingend benigne.

6.1.2 Andere Antigene

Mit dem Ziel, Korrelationen zwischen tumorspezifischen Antigenen und verschiedenen histologischen Formen des Ovarialkarzinoms zu finden, untersuchten KNAUF et al. (102) normales und kanzeröses Gewebe, das sie bei - 70° C aufbewahrten. Das Untersuchungsmaterial bestand aus zwei serösen Zystadenokarzinomen, einem muzinösen Zystadenokarzinom, einem soliden Epidermoidkarzinom und 15 normalen Ovarien. Unter gleichen Bedingungen konservierten sie Serum der Gewebespenderrinnen.

Das Gewebe wurde nach Homogenisierung zu einem Test mit PBS (phys.-gep.KS-Lsg) und zu einem Test mit PCA (Perchlorsäure)

extrahiert und zentrifugiert. Beide Überstände wurden bei - 20° C aufbewahrt.

Zur Antiserum-Herstellung wurden weiße Neuseeland-Kaninchen immunisiert, zwei mit PCA-Extrakt von zwei serösen Zystadenokarzinom (SCA₁ und SCA₂), eines mit PCA-Extrakt des soliden Epidermoidkarzinoms (SEC), zwei mit Normalovargewebeextrakt (NO). Die erhaltenen Antiseren (Anti-SCA, Anti-NO) wurden mit Normalovarextrakt und Normalserum absorbiert und immunoelektrophoretisch und in der Immundiffusion gegen Tumorgewebeextrakt untersucht. Gefunden wurden vier Antigene (A, B, C, D), die teilweise immunologische Ähnlichkeit aufwiesen.

In der Immunelektrophorese ließen sie sich in zwei neutrale (B, C), ein anionisches (A) und ein kationisches Antigen (D) unterscheiden. Keines dieser Antigene war in Normalovargewebe und Normalserum nachzuweisen.

In einer weiteren Arbeit von 1977/⁽¹⁰³⁾ berichtete die gleiche Gruppe über ein tumorassoziiertes Antigen (TAA). Untersucht wurden perchlorsäurebehandeltes Normalserum, Normalovargewebe, Serum von Ovarialkarzinom-Patientinnen Stadium III und IV und Tumorgewebe. Nach der Perchlorsäurebehandlung wurde die Reinigung mit Hilfe von Affinitätschromatographie an Con-A Sepharose (D-Mannose-Elution mit 2%-, 10%-, 25%iger Lösung) und nachfolgender Reinigung an CN-Br-aktivierter Sepharose 4 B mit gekoppelten Immunglobulinen von Kaninchen-Antiseren gegen Normalovarextrakt, normales Frauenserum durchgeführt. Mit einem Antiserum gegen die so gereinigte Fraktion TAA stellten sie eine weitere CnBr-aktivierte Sepharose-4 B-Säule her und ließen Patientin-

nenserum der Stadien III und IV darüber laufen.

Das gebundene Protein wurde mit 0,2 molarem Glycin-HCl-Puffer pH 2,8 eluiert und gegen das Antiserum getestet. Dabei zeigte sich, daß dieses Protein immunologisch identisch mit dem Protein war, das aus dem Tumorgewebe isoliert worden war. In der Immunelektrophorese zeigte TAA eine beta-Mobilität. Durch Elution von Concavalin-A-Sepharose-Säulen mittels verschiedener D-Mannose-haltiger (2%, 10%, 25%) Puffer ließen sich wenigstens drei Untergruppen unterscheiden.

1978 trennten die Autoren (104) TAA mit Hilfe von Immunelektrophorese und Sephadex G 100 Chromatographie auf.

Dabei zeigte sich, daß TAA aus bis zu sechs elektrophoretisch unterschiedlichen Untereinheiten besteht; gelchromatographisch (G 100) ergaben sich zwei Peaks, die in nachfolgende Fraktionen eingeteilt wurden (OCA, OCD). In der Doppelimmundiffusion hatten OCA und OCD keine antigenetische Ähnlichkeit. Beide Gruppen zeigten immunologische Kreuzreaktion mit CEA. Für OCA wurde eine RIA entwickelt. (Arbeitsbereich zwischen 0,5 und 2,5 ng/ml; Normalgrenze 1,8 ng/ml (105)).

Ein radioimmunologischer Vergleich von OCA und CEA im OCA-RIA- und CEA-RIA (Roche) zeigte zwischen 7 und 46% Kreuzreaktionen zwischen OCA und CEA-Standard.

Serum-OCA-Untersuchungen zeigten erhöhte Werte bei 57% von Patientinnen mit Ovarialkarzinom (N = 79), bei 13% von Patienten mit nichttumorösen gynäkologischen Erkrankungen (N = 29), bei 11% von Schwangeren (N = 19) und bei 10% von Gesunden (N = 61). Es fand sich keine Korrelation zwischen CEA und OCA-

Werten ($N = 77$, $p \leq 0,001$).

Eine weitere Reinigung von OCA erzielten die Autoren 1981 (106) mit Hilfe von Affinitätschromatographie mit CNBromid aktivierter Sepharose und Polyacrylamidgel-Elektrophorese. Das beschriebene Antigen nannten sie NB/70 K.

Die Autoren charakterisierten es als ein Glykoprotein, das in 0,6 M Perchlorsäure beständig ist, an Concanavalin A bindet und in der Elektrophorese alpha-Mobilität zeigt. Es ist radioimmunologisch unterschiedlich von normalen Serumproteinen, von Antigenen aus normalem Ovar, normaler Lunge, CEA und CEA-kreuzreagierenden Proteinen. Es wandert als Einzelbande mit einem apparenten Molekulargewicht von 70 000 D in der Gelelektrophorese. Zur Bestimmung von NB/70 K wurde ein RIA aufgestellt, aber keine Serumbestimmungen durchgeführt.

BHATTACHARYA et al. (22) untersuchten 1973 normales Ovargewebe und Gewebe von Ovarialkarzinomen. Dazu wurden saline (0,03 molare phosphatgepufferte Lösung) und Perchlorsäure-Extraktionen (0,6 molare) hergestellt. Ein Kaninchen-Antiserum gegen salinen Extrakt seröser Zystadenokarzinome wurden mit normalem Serum, Ovargewebe und Erythrozyten absorbiert und zur Untersuchung in der Doppelimmundiffusion verwandt. In Bezug auf diese Anweisungen fanden die Autoren eine antigenetische Verwandtschaft zwischen serösen und muzinösen Zystadenokarzinomen. Beide Tumoren enthielten zwei tumorassozierte Antigene. Eine schwache Präzipitationslinie zwischen Antiseren anderer Tumorextrakte (u.a. Plattenepithelkarzinom der Zervix, Uteruskarzinom, andere Ovarialkarzinome) deutete eine Kreuzreaktion mit diesen an.

Eine antigenetisch identische Präzipitationslinie zeigte Zystenflüssigkeit von serösen und muzinösen Zystadenokarzinomen im Ansatz gegen ein Antiserum gegen seröse und muzinöse Zystadenokarzinomzystenflüssigkeit.

In einer weiteren Arbeit (21) aus dem gleichen Jahr beschreiben die Autoren ein oder mehrere Antigene in serösen Zystadenokarzinomen des Ovars, die immunologisch nicht mit CEA oder bekannten Gewebsantigenen (HeLA-Antigen, Fibrinogen) identisch sind. Die Identifikation dieser Antigene erfolgte mit Hilfe von Immundiffusion, Immunelektrophorese und Immunfluoreszenz mit einem Kaninchenserum gegen salinen Extrakt aus serösen Zystadenokarzinomen, das mit Normalgewebsextrakt absorbiert worden war. Die hier beschriebenen Antigene haben ein höheres Molekulargewicht (Sephrose-Ausschluß-Peak) und wandern in der Elektrophorese in der beta-Region.

In einer 1974 durchgeführten Untersuchung der gleichen Autoren an Granulosa- und Theka-Zelltumoren des Ovars wurde zusätzlich zur salinen eine Perchlorsäureextraktion vorgenommen und Antiseren gegen Tumorextrakte und Normalgewebe hergestellt. Mittels Immundiffusion wurden zwei tumorassoziierte Antigene gefunden, die auch in Plattenepithelkarzinomen der Zervix nachweisbar waren.

Dem gegenüber zeigten sie immunologische Unterschiede gegen Antigene aus epithelialen Zystadenokarzinomen des Ovars.

In allen Extrakten von Granulosa-Zelltumoren (bis 24 ng/mg Protein in salinem Extrakt, bis 64 - 70 ng/mg Protein in PCA-Extrakten) und Serum (11 - 19 ng/ml) der Patientinnen mit

diesen Tumoren wurde radioimmunologisch CEA gefunden.

Im Ouchterlony-Test gelang der Nachweis, daß CEA und das von den Autoren in Granulosazelltumoren gefundene Antigen nicht identisch sind.

Die gleichen Autoren beschrieben 1979 zwei tumorassoziierte Antigene, die sie OCAA (ovarian cystadeno-carcinoma associated antigen) und OCAA₁ nannten (24).

Mittels Ouchterlony-Technik fand sich OCAA in 26 von 37 serösen und in allen 7 untersuchten muzinösen Zystadenokarzinomen, OCAA₁ in 30 von 37 serösen und in 5 der 7 muzinösen Tumoren; beide Antigene fehlten in benignen Zystadenomen des Ovars.

Bei der Untersuchung anderer Tumoren schien OCAA spezifischer als OCAA₁ für Zystadenokarzinome zu sein. OCAA₁ fand sich auch in einigen Kolon-, Mamma-, Pankreas- und anderen Tumoren.

Nach erfolgreicher Therapie zeigte sich ein deutlicher Abfall beider Serumantigenkonzentrationen.

Mc NEIL et al. (124) untersuchten benigne muzinöse Zystadenome des Ovars und isolierten daraus ein Antigen mit immunologischer Ähnlichkeit mit einem Mucus-Antigen aus Colonkarzinom-Schleimhautextrakten (Ouchterlony-Doppeldiffusion).

IMAMURA et al. (88) stellten Kaninchen-Antiseren gegen Extrakte von Zystadenokarzinomen her. Sie fanden mit Hilfe der Doppelimmundiffusion sechs Antigene (OVC 1 - 6). Nachweisen ließen sich diese in einer Reihe von Ovarialtumoren, nicht aber in Normalovarextrakten. OVC₄ wurde als CEA, OVC₅ als NCA (non-specific cross-reacting antigen) identifiziert. OVC₃ war identisch mit PZP, PAG = SP 3 (pregnancy zone protein).

OVC₆ wurde nur in dem zur Immunisierung verwendeten Tumor gefunden. OVC₁ fand sich in 48 von 93 epithelialen Tumoren des Ovars, in einigen Zervix-, Mamma-, Magen und Pankreaskarzinomen. Seine Anwesenheit in der Plazenta und im Fruchtwasser läßt darauf schließen, daß es sich um ein neues schwangerschaftsassoziertes Protein handelt. OVC₁ zeigte im Vergleich immunologische Identität mit dem Antigen OCAA₁ von BHATTARACHYA et al.

OVC₂ konnten die Autoren nur in Ovarialkarzinomen (8/93) in der Plazenta, im Fruchtwasser und im fetalen Magen-Darm-Trakt nachweisen, nicht aber in anderen Tumoren oder Normalgewebe von Erwachsenen.

Ähnliche Untersuchungsergebnisse werden von LLOYD et al. (119, beschrieben.

Auch sie fanden OVC₁ und OVC₂ in Plazenta und Fruchtwasser. OVC₁ wird von ihnen als ein Glykoprotein (Mg 50 000) beschrieben. OVC₂ (Mg 64 000) wurde in 8/99 Ovarialkarzinomen gefunden, nicht aber in anderen Karzinomen.

Auch BURTON et al. (42,43) untersuchten Extrakte maligner Ovarialtumoren mit Kaninchenserum gegen Perchlorsäureextrakte. Sie fanden ein bei 100° C hitzestabiles tumorassoziertes Antigen (TA) mit Hilfe der Immundiffusion und des Komplementbindungstestes im Ovarialkarzinom, einigen benignen Ovarialcysten, normaler Zervix, nicht jedoch in normalem Ovar, Plasma, AB-Erythrozyten, Leukozyten, Plazenta, Hirn, Herz, Leber, Lunge, Milz, Sigma und Niere. Sein Molekulargewicht wurde mit 27 000 - 30 000 D angegeben. In der Immunelektrophorese zeigt es beta-Mobilität.

Den gleichen Autoren gelang 1977 (44, 45) der Nachweis von insgesamt fünf Antigenen in Ovarialkarzinomen, nachdem sie Antiseren gegen Tumorextrakt mit Normalovarextrakt und Plasma absorbiert hatten.

Die fünf Antigene (A 1 - 4, TA) fanden sich sowohl in Tumor- als auch in Normalgewebe-Extrakten. Bei einem Vergleich ihrer Thermostabilität war TA noch bei 100° C stabil, während A₁ - A₃ schon bei 56° C und A 4 bei 80° C inaktiviert wurden. BAGSHAW et al. (8,9) beschrieben ein Antigen, das im salinen Extrakt eines serösen papillären Zystadenokarzinoms des Ovars gefunden wurde. Präzipitationstests zeigten, daß die Konzentration im Tumorextrakt zehnmal größer ist als im Normalgewebs-extrakt. Sein Molekulargewicht wurde auf 100 000 bis 150 000 D geschätzt. In der Elektrophorese zeigten sich eine Haupt- und eine Nebenbande mit antigenetischer Aktivität.

Radioimmunologische Serumkonzentrationsmessungen ergaben bei Normalpersonen Werte bis 120 ng/ml, 2/3 von ihnen hatten Werte unter 40 ng/ml. Ähnliche Werte wurden bei Patientinnen mit anderen Karzinomen gefunden, während Patientinnen mit Ovarialkarzinom Werte zwischen 30 bis 850 ng/ml aufwiesen. Bei diesen lagen Asziteskonzentrationen des Antigens zwischen 250 und 2 100 ng/ml.

GERBER et al. (71) untersuchten Antiseren gegen salinen Extrakt von serösen Zystadenokarzinomen des Ovars. Sie fanden ein Glykoprotein, das in dem Ausschluß-Volumen einer Sephadex-G-200-Säule erscheint. Es ist immunologisch nicht identisch mit Kolon-CEA. Es ließ sich mit Hilfe der Immunofluoreszenz

im Zytoplasma von 9 Ovarialkarzinomen nachweisen. Im normalen Ovar wurde es nicht gefunden.

Untersuchungen von CHATTERJEE et al. (47,48) mit Homogenaten von Normalovar und epithelialen Ovarialadenokarzinomen zeigten im Tumor eine signifikant erniedrigte Aktivität von Cytidin-5-monophospho-N-Acetyl-neuraminsäure-Hydrolase. In präoperativen Seren dieser Patientinnen war die Aktivität dieses Enzyms doppelt so hoch als in einem normalen Kollektiv. Nach Tumorentfernung zeigte sich ein Aktivitätsabfall, die Konzentration war jedoch immer noch höher als bei Nichttumorkranken.

BENHAM et al. (20) untersuchten Isoenzymmuster der alkalischen Phosphatase mit Hilfe der Elektrophorese. Sie fanden in 5/7 = 78% malignen und in 2/11 benignen Tumoren ein Isoenzym mit größter Ähnlichkeit zur plazentalen alkalischen Phosphatase. Es zeigte sich lediglich in der Elektrophorese eine geringe Abweichung in der Mobilität (ähnlich der D-Variante.).

6.2 Serum-Untersuchungen

6.2.1 CEA

LAMERZ et al. (113) untersuchten im RIA 2095 Seren von Patientinnen, die alle wegen Mammakarzinom mastektomiert waren. Von 1462 metastasenfreien Patientinnen hatten 91% normale CEA-Serumspiegel (≤ 3 ng/ml) und 98% ≤ 5 ng/ml. Von 633 Patientinnen mit generalisierter Metastasierung wiesen 54% erhöhte CEA-Spiegel > 3 ng/ml und 43% > 5 ng/ml auf. Die Höhe der CEA-Spiegel war von der Lokalisation der Metastasen abhängig.

So zeigten nur 6% von Patientinnen mit Lymphknoten-Metastasen Werte > 5 ng/ml, während in 60% erhöhte Spiegel bei Patienten m.Knochen-, Lungen- und Lebermetastasierung zu messen waren. Eine schwache Korrelation zeigte sich zwischen CEA-Serumspiegel und alkalischer Phosphatase und Gamma-GT-Aktivität. Bei Verlaufsstudien war eine gute Korrelation zwischen Progression und Höhe des CEA-Spiegels sowie zwischen Remission und CEA-Spiegelabfall festzustellen.

Die Gruppe von DISAIA et al. (56) wandte ebenfalls eine radioimmunologische Untersuchungsmethode an (eigener RIA- und Roche-Assay). In einer 1975 veröffentlichten Studie (57) gaben sie bei Patientinnen mit verschiedenen gynäkologischen Karzinomkrankungen fortgeschrittener Stadien einen Anteil von nahezu 50% mit einem erhöhten Plasma-CEA-Spiegel an. Eine Erhöhung in 84% (21 von 25) bestand bei Patientinnen mit Rezidiv eines Plattenepithel-Zell-Karzinoms der Zervix.

In einer weiteren Studie (58) untersuchten die gleichen Autoren den Zusammenhang zwischen CEA-Serumkonzentration und Tumorstadium. Dabei wurden folgende Ergebnisse gefunden: Nur 14 von 156 (9%) Patientinnen mit einem carcinoma in situ der Zervix hatten einen erhöhten CEA-Spiegel. Bei 166 Patientinnen mit einem invasivem Plattenepithel-Karzinom der Zervix fand man bei 26% im Stadium I und bei 88% im Stadium IV einen ansteigenden CEA-Spiegel. Wie in ihrer 1975 veröffentlichten Studie zeigten 85% der Patientinnen mit Rezidiv einen positiven CEA-Spiegel. Ähnliche Ergebnisse fanden die Autoren bei Adenokarzinomen des Endometriums, des Ovars und beim Vulvakarzinom.

Auch zeigten sie, daß nach chirurgischer oder internistischer Therapie ein Abfall des Serum-CEA-Wertes zu messen war.

In einer zwölfmonatigen Langzeitstudie fanden KHOO et al. (96) bei 213 Patientinnen mit Ovarialkarzinom in 35% der Fälle keine Erhöhung des CEA-Spiegels. Kaum erhöhte bis negative Werte zeigten sich bei nicht fortgeschrittenen Tumorstadien. Hohe und wieder ansteigende Werte wurden bei fortgeschrittenen Tumorstadien gemessen. Lediglich 6 falsch-positive und 4 falsch-negative Werte wurden während der ganzen Untersuchungsperiode gefunden.

Nach den Untersuchungen von STIGLMAYR et al. (163) zeigten 62% (13/21) der Patientinnen mit Ovarialkarzinom und 60% (18/30) mit Kollumkarzinom erhöhte CEA-Spiegel (14 Fälle mit Stadium III und IV). Beim Mammakarzinom wurden in 42% (13/31) erhöhte Werte gefunden (in 10 der 13 positiven Fällen hatte der Tumor die Organgrenze bereits überschritten). Beim Korpuskarzinom waren unabhängig vom Tumorstadium nur 14% (4/28) der Serumwerte erhöht. Bei acht untersuchten Seren von Patientinnen mit Vulva- und Vaginalkarzinom wurden 4 erhöhte CEA-Werte gemessen. Bei ihren Serum-CEA-Untersuchungen bei Patientinnen mit Zervixkarzinom im Vergleich zu Gesunden und Patientinnen mit benignen gynäkologischen Erkrankungen kamen van NAGELL u. Mitarbeiter (129) zu folgenden Ergebnissen: von 176 gesunden Probandinnen zeigten 157 (88%) normale und 19 (11%) leicht erhöhte CEA-Spiegel. Von 95 untersuchten Patientinnen mit benignen Erkrankungen hatten lediglich 17 (18%) leicht erhöhte Werte, von denen keiner über 10 ng/ml lag. Von 100 Patientinnen mit Zervix-

karzinom lagen in 71 Fällen die Werte im Normbereich, bei 28 Fällen wurden leicht erhöhte Werte gemessen, und nur bei einer Patientin lag der Wert über 10 ng/ml.

In weiteren Veröffentlichungen (131,132) derselben Arbeitsgruppe beschränkten sich die Untersuchungen auf Patientinnen mit endometrialem Adenokarzinom. Dabei war eine direkte Korrelation zwischen CEA-Erhöhung und Größe des Uterus, Histologie und Stadium der Erkrankung festzustellen. Weiter war postoperativ ein deutlicher Abfall des CEA-Spiegels bei 58/60 (97%) der untersuchten Patientinnen zu messen. Bei den restlichen zwei Patientinnen, die keinen CEA-Spiegel-Abfall zeigten, wurde nach kurzer Zeit ein Tumorrezidiv gefunden.

In einer Vergleichsstudie (133) zweier histologisch verschiedener Zervix-Karzinome wiesen Patientinnen mit einem endozervikalen Adenokarzinom höhere CEA-Spiegel als Patientinnen mit einem Plattenepithel-Zellkarzinom der Zervix auf. Weiter zeigte sich, daß bei Patientinnen mit auch nach Therapie gleichbleibend hohen CEA-Werten unbedingt ein okkult gebliebener Resttumor oder ein Rezidiv ausgeschlossen werden müssen.

Mit der Immunperoxidase-Färbetechnik wiesen die gleichen Autoren (134) in 21% der muzinösen und 2% der serösen Zystadenokarzinome des Ovars eine positive Anfärbung nach, die einer CEA-Konzentration von mindestens 2 µg/g entspricht; bei invasivem Zervixkarzinom färbten sich 63% von 154 Tumoren.

Die Serumuntersuchungen beider Studien bestätigten, daß die höchsten Konzentrationen bei weit fortgeschrittenen Tumorstadien zu messen sind.

Bei Untersuchung (130) von Zystenflüssigkeit von Zystadenokarzinomen des Ovars ließ sich erst bei einer CEA-Erhöhung von 4 - 16 µg/ml eine Serum-CEA-Konzentration von 2,5 ng/ml nachweisen. Beim muzinösen Ovarialkarzinom waren dabei die höchsten CEA-Werte zu messen.

YAMASHITA et al. (179) konnten in Untersuchungen von Zystenflüssigkeiten bei muzinösen Zystadenokarzinomen des Ovars signifikante CEA-Konzentrationen messen. Bei Vergleichen dieses CEA mit aus Kolonkarzinomen gewonnenen CEA-Präparationen waren keine Unterschiede hinsichtlich Gelfiltrations- und Elektrophorese-Verhalten festzustellen. Auch im Doppeldiffusionstest nach OUCHTERLONY und im Radioimmunoassay-Vergleich konnte ein identisches Verhalten gezeigt werden.

BARRELET et al. (15) untersuchten Seren von 63 Patientinnen mit histologisch gesicherten gynäkologischen Karzinomen unter Verwendung eines Radioimmunoassays. Messungen fanden vor und nach Therapie statt. 31 von 63 hatten erhöhte CEA-Spiegel. Unterschiede zeigten sich in Abhängigkeit von den Tumorarten: höhere Werte bei Karzinomen von Korpus und Zervix des Uterus, niedrigere beim Ovarialkarzinom. Der Serumspiegel fiel ab, wenn der Tumor radikal entfernt werden konnte. Bei palliativer Therapie blieb er konstant. Keine Korrelation wurde zwischen klinischem Status und Höhe des CEA-Spiegels festgestellt.

ITO et al. (90) 1978 maßen radioimmunologisch die Serum-CEA-Spiegel von 86 Patientinnen mit Plattenepithel-Karzinomen der Cervix uteri aller Stadien. 35 von 74 Patientinnen mit invasivem Tumorwachstum zeigten einen erhöhten Spiegel, während

alle Patientinnen mit einem carcinoma in situ Normalwerte aufwiesen.

KJORSTAD et al. (97) untersuchten Serum-CEA-Spiegel bei Patientinnen mit Adenokarzinom des Uterus. Von 101 Seren zeigten im RIA 34% der Korpuskarzinome rund 68% der Zervixkarzinome erhöhte Spiegel. Eine direkte Korrelation bestand zwischen Positivitätsrate und dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen.

Die gleichen Autoren (98) verwandten einen modifizierten CEA-Roche Kit, um bei 156 Patientinnen mit einer intraepithelialen Neoplasie und invasiven Plattenepithel-Karzinomen der Zervix den CEA-Serumspiegel zu messen. Sie fanden eine positive Korrelation zwischen Tumolvolumen und CEA-Spiegel bei invasiven Tumoren. Auch Patientinnen mit intraepithelialen Neoplasien hatten erhöhte Spiegel im Vergleich zu gesunden Blutspendern.

Bei 80% der 156 gemessenen CEA-Spiegel wurde ein Abfall des Spiegels nach Therapie beobachtet.

BOLLA et al. (31,32) berichteten über eine Langzeitstudie mit einem CEA-Radioimmunoassay in 123 Fällen mit Zervixkarzinom. Die erste Messung erfolgte vor Therapiebeginn, weitere während und nach der Therapie. Im Stadium I waren die CEA-Spiegel in 21% im Stadium II in 36% und im Stadium III in 48% erhöht. Am Therapieende bzw. bei vollständiger Beseitigung der Tumoren wurden in 80% bzw. 100% normale CEA-Spiegel gemessen. Bei Persistenz oder Wiederauftreten hoher CEA-Werte wurden Tumorrezidive festgestellt.

Das gleiche Team (33) untersuchte Korrelationen zwischen CEA-Serumspiegel und klinischem Stadium, Histologie und Überlebenszeit bei 115 Patientinnen. In Fällen mit Zervixkarzinom fanden sie einen Anteil von 35% mit erhöhtem CEA-Spiegel. Keine Relationen ergaben sich zu Stadium der Erkrankung, Histologie, Lymphangiogramm und Überlebenszeit. Ein Abfall auf Normalwerte zeigte sich bei kurativer Bestrahlung. Persistierende hohe Werte wurden bei palliativer Therapie festgestellt, wiederauftretende hohe Werte bei Rezidiven.

SAMAAN et al. (150) verglichen Human-Plazenta-Lactogen (HPL oder HCS), die beta-Untereinheit von humanem Choriongonadotropin (beta-HGG) und CEA. Untersuchungsgut waren 65 Patientinnen mit Ovarialkarzinom. 51 hatten epitheliale Tumoren, 14 Keimzelltumoren. Bei 41 Patientinnen wurden hohe HPL-, bei 29 hohe beta-HCG- und bei 34 hohe CEA-Spiegel gefunden. Bei 20 Patientinnen wurden Messungen vor und nach Operation und während Chemo- oder Bestrahlungstherapie vorgenommen. Zwischen diesen Werten und dem Verlauf der Erkrankung waren keine konstanten Korrelationen zu erkennen.

RUTANEN et al. (149) untersuchten die CEA-Serumspiegel in je einer Gruppe von Patientinnen mit malignen und nichtmalignen gynäkologischen Tumoren. Der Serum-CEA-Spiegel wurde radioimmunologisch, das Gewebe-CEA mit Hilfe der Immunperoxidase-technik gemessen. Unter 328 gynäkologischen malignen Tumoren fanden sich 32 Fälle mit erhöhtem CEA-Spiegel.

Bei fortgeschrittenen Stadien fanden sich höhere CEA-Werte. Auch in 5 von 85 Fällen mit benignen Tumoren war CEA im Serum erhöht. Die höchsten Positivitätsraten hatten Patientinnen mit Ovarialkarzinom. Auch hier war eine Abhängigkeit des Serum-CEA-Spiegelverlaufs vom Erfolg der Therapie nachweisbar. Der färberische Nachweis von Gewebe-CEA konnte sowohl in frühen als auch in fortgeschrittenen Stadien geführt werden. Alle benignen Tumoren waren CEA-frei. Die höchsten Werte fanden sich bei Plattenepithel- und Adenokarzinomen der Zervix.

BORN et al. (34) untersuchten die diagnostische Brauchbarkeit der radioimmunologischen CEA-Bestimmung für die Verlaufsbeurteilung von Patientinnen mit Mamma-, Kollum- und Korpuskarzinomen. Bei 83% der Mammakarzinom-Nachsorgepatientinnen lag der CEA-Spiegel im Normbereich, 17% zeigten erhöhte Werte. Ähnlich waren die Ergebnisse bei Kollum- und Korpuskarzinomen. Karzinompatientinnen mit gesicherter Metastasierung wiesen in 48% erhöhte CEA-Werte auf.

ANGER et al. (4) untersuchten Serum von Patientinnen mit gynäkologischen Tumoren, Zysteninhalt von Ovarialtumoren und Aszites. Die Karzinom-Patientinnen zeigten im Vergleich zu Kranken mit benignen Ovarialtumoren deutlich höhere Werte. Beim Mamma-Karzinom lagen die Spiegel deutlich über den bei Kollum- und Korpuskarzinom-Kranken bestimmten.

SEPPÄLÄ et al. (161) untersuchten im radioimmunologischen Assay AFP und CEA bei 53 Patientinnen mit Ovarialkarzinom, bei 16 mit anderen malignen Ovarialtumoren und bei 31 mit nicht-malignen Erkrankungen des Genitaltraktes. 11 Patientinnen mit

Ovarialkarzinom, 2 mit Endometrium-Karzinom, 1 mit Zervix-Karzinom und 1 mit einem benignen embryonalen zystischen Teratom des Ovars hatten erhöhte Serum-CEA-Spiegel, wobei es sich jeweils um fortgeschrittene Stadien der Tumor-Erkrankung handelte. Die AFP-Spiegel waren mit einer Ausnahme normal. STONE et al. (166) untersuchten die CEA- und beta-HCG-Spiegel in Ovarialkarzinomen der Stadien III und IV unter Chemotherapie. Alle 26 Tumoren waren histologisch seröse oder endometrioide Zystadenokarzinome. CEA und beta-HCG wurden mit Hilfe eines RIA (Doppelantikörpermethode) gemessen. 9 der 26 Patientinnen hatten erhöhte CEA-Spiegel und 13 von 26 erhöhte beta-HCG-Spiegel.

6.2.2 AFP

SELL et al. (155) fanden mit der radioimmunoелеktrophoretischen Technik (RIEP) bei Serumuntersuchungen von 8 Frauen, die an einem endodermalen Sinustumor erkrankt waren, bei 6 einen erhöhten AFP-Spiegel. Weiter wiesen sie nach chirurgischer Therapie bei 2 dieser Patientinnen einen Rückgang der Serum-AFP-Konzentration nach.

BAHARI et al. (10) berichteten über ein 14-jähriges Mädchen mit einem erhöhten Serum-AFP-Spiegel von 1.800 ng/ml (Normalwert - 250 ng/ml) und einem tastbaren Tumor im Unterbauch, der sich postoperativ als Teratom erwies. Postoperativ fiel der Serum-AFP-Spiegel auf den Normalwert zurück.

Auch BAGSHAWE et al. (8) bejahen in einer Übersicht die Bedeutung der Messung von AFP-Konzentration bei malignen Teratomen. Speziell beim endodermalen Sinustumor (Dottersacktumor) ist die AFP-Serum-Konzentration eng mit dem Ausbreitungsgrad der Erkrankung korreliert.

In einer Arbeit über den Verlauf von AFP-Serum-Konzentrationen bei verschiedenen gynäkologischen Tumoren (RIA's) fanden LAMERZ et al. (111) bei einer Patientin mit einem Teratom einen deutlich erhöhten AFP-Spiegel von 430 ng/ml (bei Kontrolle 230 ng/ml, Normalwert 5 ng/ml). Unter 14 Patientinnen mit Ovarialkarzinom hatte nur eine einen erhöhten AFP-Wert, der trotz Operation und Radiotherapie mit 118 ng/ml erhöht blieb. Bei einer Patientin mit Chorionepitheliom des Uterus wurde präoperativ ein normaler AFP-Spiegel gemessen, der kurz vor der Operation auf 165 ng/ml anstieg, um dann 1 Tag postoperativ auf 31 ng/ml abzufallen.

6.2.3 Ferritin

Bei der Untersuchung von Serum-Ferritin-Konzentrationen mit Hilfe eines RIA's (Zweiphasenmethode) kamen ITO et al. (91) zu folgenden Ergebnissen: von 98 Patientinnen mit einem unbehandelten Zervixkarzinom hatten 50 (51%) einen erhöhten Ferritinspiegel. Dabei zeigte sich auch eine Abhängigkeit der Serum-Konzentration vom Tumorstadium. Während nur 4 von 30 (10%) im Stadium 0 - I einen erhöhten Spiegel aufwiesen, war dies bei 46 von 68 (79%) im Stadium II - IV der Fall.

6.2.4 Weitere Antigene

BAGSHAWE et al. (9) fanden eine gute Korrelation zwischen der Höhe der beta-HCG-Konzentrationen im Serum oder Urin von Patientinnen mit einem Chorionkarzinom und der Tumorgröße. Um Chorionkarzinom-Metastasen im ZNS nachzuweisen, empfahlen sie eine vergleichende Messung der beta-HCG-Spiegel im Liquor und Serum.

Bei einem Verhältnis: Serum- zu Liquorkonzentration $< 60:1$ besteht ein großer Verdacht auf Metastasen im ZNS.

CHATTERJEE et al. (47) untersuchten die Cytidin-5-monphospho-N-acethylneuramidase-Aktivität in Seren von gesunden Frauen und bei Patientinnen mit einem epithelialen Adenokarzinom. Die spezifische Aktivität des Enzyms im Serum der Tumorpatientinnen war signifikant erhöht. Nach operativer Entfernung des Tumors fand sich zwar eine niedrigere, aber im Vergleich zu gesunden Personen immer noch auf das Doppelte der Norm erhöhte Aktivität. Ein weiteres Marker-Enzym wurde von WOLF et al. (176) beschrieben. Sie untersuchten in einer Doppelblindstudie die Plasmari-bonukleaseaktivität bei Gesunden und an Ovarialkarzinom Erkrankten. Bei 56 von 62 der Patientinnen fand sich eine signifikant erhöhte Aktivität der Ribonuklease. Bei einer Zuordnung zu den verschiedenen Tumorstadien (nach FIGO) fanden sich keine statistisch faßbaren Unterschiede. Eine nach den verschiedenen Tumortypen getrennte Analyse wurde wegen der relativ geringen Fallzahl nicht durchgeführt.

Von KNAUF et al. (102) wurden bei Serumuntersuchungen mit Hilfe eines RIA's keine Relation zwischen dem von ihnen unter 6.1.2 beschriebenen tumorassoziierten AG (SCA) und der Tumorphistologie festgestellt.

7. Eigenuntersuchungen

7.1 Material

Die Tumoren wurden sofort nach der operativen Entfernung und Abpräparation des Bindegewebes in Plastikfolien eingeschweißt, bei -20°C eingefroren und möglichst noch am gleichen Tag in einer Kühltruhe bei -70°C bis zur endgültigen Verarbeitung gelagert. Insgesamt wurden so 17 Tumoren gepoolt (Tab. 6). Histologisch handelte es sich um zwei Granulosazelltumoren, ein seröses benignes Zystadenofibrom, ein beginnendes Adenokarzinom des Colons, ein monozelluläres, gering differenziertes Adenokarzinom - möglicherweise eine Metastase eines Magenkarzinoms -, ein gering differenziertes Karzinom - möglicherweise ein adenometnoides Ovarialkarzinom oder eine Metastase eines Kollumkarzinoms. Bei den übrigen 11 handelte es sich eindeutig um Adenokarzinome des Ovars. Von diesen waren sechs seröse Zystadenokarzinome, zwei muzinöse Zystadenokarzinome und drei Adenokarzinome proliferierenden Typs. Normales Ovargewebe stammte von Patientinnen, die wegen eines anderen Tumors ovariectomiert worden waren. Bei allen wurde ein Ovarialkarzinom ausgeschlossen. Insgesamt wurden 25 Ovarien gewonnen und wie oben beschrieben, behandelt.

Außerdem wurden 285 Seren von insgesamt 164 an Ovarialkarzinom erkrankten Patientinnen im Alter zwischen 20 und 90 Jahren untersucht (80% zwischen 40 und 70 Jahren).

Es handelt sich dabei um Patientinnen der II. Universitäts-Frauenklinik, der II. und III. Medizinischen Klinik des Klinikums Großhadern der Universität München und der Nachsorgeklinik Bad Trissl (Tab. 7)

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß bei 51% der Patientinnen weit fortgeschrittene Tumorstadien vorlagen.

Die in den Krankenakten zum Teil nach der TNM-Klassifizierung getroffene Einteilung wurde einheitlich auf die FIGO-Stadien umgestellt, wie unter 4.6 beschrieben (Tab. 2).

7.2 Methodik

7.2.1 Analytische Verfahren

7.2.1.1 Eiweißbestimmung

Die Gesamt-Eiweißbestimmung erfolgte nach der BIURET-Methode von WEICHSELBAUM (II) als Mikroverfahren (0,02 ml Serum, 1,0 Biuret-Reagenz₁). Im Spektral-Photometer₂ wurde bei 546 nm abgelesen.

1 Fa. Merck, Darmstadt

2 Fa. Hitachi-Perkin-Elmer 139 Spektr.Ph.

7.2.1.2 Immunelektrophorese

Untersucht wurde nach dem Verfahren von GRABAR und WILLIAMS (76) in der Mikromodifikation von SCHEIDEGGER (152) auf Objektträger in der Universal-Elektrophorese-Kammer₁ bei einer Spannung von 200 V und einer Stromstärke von 25 mA und der Laufzeit von 60 min. Das verwendete Gel war 2%iger Reinagar₂ in einem 1:2 verdünnten Veronal-Na-Na-Acetat Puffer pH 8.6 nach MICHAELIS (125) mit Cialit-Zusatz₃. Zum Schluß wurde mit Azocarmin in einer Eisessig-Methanol-Lösung (1:10 V/V) gefärbt.

7.2.1.3 Zweidimensionale Doppeldiffusion (Ouchterlony)

Bei der zweidimensionalen Doppeldiffusion nach Ouchterlony (136) wird ein Objektträger mit 2%igem DIFCO-Agar₄ beschichtet. Mit einer speziellen Stanze₅ wurden 6 - 8 Löcher mit einem Durchmesser von 2 mm um ein zentrales Stanzloch mit einem Durchmesser von 2 - 4 mm gestanzt. Nach einer Diffusionszeit von 24 bis 48 Stunden wurden die Objektträger in physiologischer NaCl-Lösung für 24 Stunden gewässert, dann 24 Stunden getrocknet und danach mit Azo-Karmin-Lösung gefärbt. Die überschüssige Farbe wurde mit einer Eisessig-Methanol-Lösung (1:10) entfernt.

1 Fa. Lamag, Muttentz, Schweiz

2 Fa. Behringwerke, Marburg

3 Fa. Asid, Lohhof b. München

4 Fa. DIFCO Lab., Detroit, Mich. USA

5 Fa. Boskamp, Hersel b. Bonn

7.2.1.4 Radioimmunoassay

Markierung

Gereinigtes CEA und AFP, OCAA₃, OCAA₄ wurde mit ¹²⁵J (Na-Jodid) nach der Chloramin T-Methode von HUNTER (87) markiert. Das durch Chloramin T oxidierte Jodid wird als reaktives Jod abhängig von Reaktionsdauer und Konzentration des zu markierenden Materials vorwiegend in Tyrosin-Gruppen von Proteinen eingebaut. Ein Reduktionsmittel, wie z.B. Na-Bi-Sulfit, kann die Reaktion augenblicklich stoppen. Um eine Schädigung des zu markierenden Proteins und damit eine Herabsetzung der Immunreaktivität so niedrig wie möglich zu halten, sollte vor Reaktionsbeginn durch Testung die geringste Konzentration der zu reagierenden Stoffe und die Reaktionszeit ermittelt werden. Die kommerziell erworbene Radioaktivität von 1mCi Natrium ¹²⁵Jodid wurde vor der Markierung mit 50 bis 100 µl Phosphat-Puffer, 0,5 M pH 7,5 verdünnt. Nacheinander wurden folgende Substanzen in 1 ml Kunststoff-Pipetten-Gefäße₁ pipettiert und auf einem Spezialeschüttler₁ gemischt:

20 µl ¹²⁵J als Na-Jodid = 0.2 mCi (1. Aktivitätsmessung₂) = eingesetzte Gesamtaktivität.

10 µl Phosphat-Puffer 0.5 M pH 7.5

20 µl Protein (AFP, CEA, OCAA₃ OCAA₄) = ca. 5 µg in 0.05 M Phosphat-Puffer pH 7.5

20 µl Chloramin T (= 50 µg in 0.05 M Phosphat-Puffer pH 7.5) nach Mischung Inkubation über 25 Sekunden, danach

25 µl Na-Disulfit (= 12 µg in 0.05 M Phosphat-Puffer pH 7.5)

500 µl KJ (Kalium-Jodid)

200 µl 0.05 M Phosphat-Puffer mit 2% bovinem Serumalbumin (BSA)

1 Fa. Eppendorf, Hamburg

2 Fa. Telefunken

Reinigung des ^{125}J -markierten Proteins

Am Vortag der Markierung wurden 2 Säulen (Nr. 1: zur Entfernung nicht gebundener Aktivität; Nr. 2: zur Gewinnung einer homogenen markierten Proteinfraktion) vorbereitet.

Nr. 1: Sephadex G 50 Fine, 1 x 15 cm

5 g Sephadex G 50 Fine wurden für 6 Stunden in 0,07 M Veronal-Puffer pH 8,6 eingeweicht. Mit einer Wasserstrahlpumpe wurde das Material entgast und daraus eine Säule gegossen und mit 10 ml Veronal-Puffer nachgewaschen. Kurz vor Inbetriebnahme der Säule erfolgte ein Vorlauf von 1 ml Veronal-Puffer mit 2,5% BSA.

Nr. 2: Sephadex G 100 für AFP, Sephadex G 200 für CEA
1,5 x 35 - 40 cm

5 g Gel wurden in 0,07 M Veronal-Puffer pH 8,6 für 6 Stunden eingeweicht, anschließend entgast u. in eine Säule gegossen. Vor Benutzung wurde mit 50 ml Veronal-Puffer 0,1 M mit 0,1% BSA und 0,9% NaCl nachgewaschen.

Das oben aufgeführte Reaktionsgemisch und ein Nachspülvolumen wurden auf die Säule Nr. 1 aufgetragen. Mit Hilfe eines Fraktionskollektors₁ wurden 1 ml-Fraktionen in Eppendorf-Gefäßen gesammelt, in die je 0,2 ml 0,07 M Veronal-Puffer mit 2,5% BSA vorgegeben wurden. Die Elution erfolgte mit 0,07 M Veronal-Puffer pH 8,6. Die Aktivitäten der Fraktionen wurden einschließlich der verlorenen Aktivität (Reaktionsgefäß, Pipettenspitze) in einem mäßig empfindlichen Gamma-Zähler₂ gemessen (2. Aktivitätsmessung).

1 Fa. LKB Produkter, Bromma, Schweden

2 Fa. Telefunken

Die Fraktionen 1 bis 2 des Proteinpeaks mit der höchsten Aktivität wurden ohne vorherige Einengung auf die Säule Nr. 2 aufgetragen, mit dem oben genannten Elutionspuffer eluiert und wieder in 1 ml-Fraktionen gesammelt und im Gamma-Zähler gemessen (3. Aktivitätsmessung). Es wurden gemäß dem Radioaktivitäts-Diagramm/Einzelfraktionen zu Sammelfraktionen zusammengeschüttet und zur weiteren Testung verwendet. Die Berechnung der spezifischen Aktivität und Bindungsaktivität erfolgte nach laboreigenen Programmen auf einem elektronischen Tischrechner HP 41 C (s. 7.2.1.5).

Testung des ersten Antikörpers (Antikörper-Verdünnungskurve)

Um eine geeignete Verdünnung des ersten Antikörpers für die Standard-Inhibitionskurve des Radioimmunoassays zu ermitteln, wurde eine Antikörper-Verdünnungskurve erstellt. Dazu wurde eine konstant geeignete Verdünnung des Tracers (markiertes Antigen) und des zweiten Antikörpers ermittelt, die der variablen Konzentration des ersten Antikörpers in einer geometrischen Verdünnungsreihe gegenüberstanden. Als erstes wurden konstante Mengen der Verdünnungsreihe der ersten Antikörper mit konstanten Mengen des markierten Proteins zusammengegeben. Nach der Erstinkubation von 24 h (R.T.) wurden die meist löslichen Immunkomplexe ($^{125}\text{-J-AFP-Anti-AFP-IgG}$, $^{125}\text{-J-CEA-Anti-CEA-IgG}$) durch einen zweiten Antikörper (Anti-Kaninchen-Gammaglobulin von der Ziege) in einer zweiten Inkubation von 24 h (R.T.) zu größeren Komplexen verstärkt. Diese konnten nach Zentrifugation und Dekantierung des Überstandes im Gamma-Zähler gemessen werden.

Als geeignete Verdünnung wurde für den zweiten Antikörper 1:20 bzw. 1:30 ermittelt.

In die Röhrchen₁ wurden folgende Volumina pipettiert:

(Verdünnungs-Puffer: 0,01 M Phosphat-Puffer + 1% BSA + 0,15 M NaCl + 0,4% EDTA-Titriplex, pH 8,2 eingestellt mit 1 N NaOH)

- a) Total: 100 µl markiertes Antigen +
- b) N-Wert (unspezifische Bindung)
 - 100 µl markiertes Antigen
 - 400 µl Verdünnungs-Puffer
 - sonst wie c ohne 1. Antikörper
- c) Probe 200 µl RIA-Verdünnungspuffer + 5 - 10% Pferdeserum
 - 100 µl markiertes Antigen + Kaninchenserum₂
 - 100 µl 1. Antikörper der ermittelten Verdünnung
nach Mischung und Inkubation für 24 h (R.T.)
 - 100 µl 2. Antikörper (Verdünnung 1:20 - 1:40)

Nach erneuter Inkubation (24 h R.T.) erfolgte eine Zentrifugation bei 3 000 UpM für 30 Minuten (R.T.). Anschließend wurde dekantiert, die Röhrchen für 10 Minuten auf den Kopf auf einen saugfähigen Karton gestellt und danach vorsichtig mit Filterpapierschnitzeln innen ausgewischt bis etwa 0,5 cm oberhalb des Bodens, dann wurde im Gamma-Zähler für 2 Minuten/Röhrchen gezählt. (Berechnung der Aktivitätsprozent-Werte (7.2.1.5)).

- 1 Polystyren-Röhrchen 12 x 55 mm Fa. Bon
- 2 Fa. Behringwerke, Marburg

Standard-Inhibitionskurve (Standard-Verdrängungskurve)

Prinzip:

Markiertes und nichtmarkiertes Standard- bzw. Analysen-Antigen konkurrieren im RIA um freie Bindungsstellen an einer begrenzten Anzahl Antikörper. Durch einen zweiten Antikörper, der gegen Immunglobulin der Spezies des 1. Antikörper-Bildners gerichtet ist oder durch Immunkomplex-Fällung, wie z.B. durch gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung, Polyäthylenglycol-Lösung oder Zirconyl-Phosphat-Gel, können die entstandenen, meist löslichen Immunkomplexe gefällt und nach Dekantierung und Entfernung des nicht präzipitierten Überstandes (enthält nicht gebundene Aktivität) im Gamma-Zähler gemessen werden. Um später die Analysenproben ablesen zu können, muß eine Eichkurve bzw. Standardmeßkurve erstellt werden. Zum Schluß kann dann, nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor, die Endkonzentration berechnet werden. Die Standardmeßkurve wird durch die Standard-Inhibitionskurve dargestellt. Sie errechnet sich aus der relativen Verdrängung des markierten Antigens vom Antikörper durch die in der Standard-Verdünnungsreihe fallende Konzentration des gewünschten Standards in bezug auf die maximale Bindung von markiertem Antigen und Antikörper ohne Standard (= 100%). Als Bindungskapazität wird die maximale Bindung in Prozenten der Gesamtaktivität (= Total) bezeichnet. Im Doppel-Antikörper-RIA-System liegt die optimale Bindungsaktivität meist zwischen 20 und 40%.

Folgende Volumina wurden als Doppelbestimmung angesetzt:

AFP-Radioimmunoassay:

a) Total und b) N-Wert wie oben beschrieben;

c) Standard:

200 µl RIA-Verdünnungspuffer + 10% Pferdeserum₁

100 µl Standard-Lösung in Verdünnungspuffer entsprechend einer geometrischen Reihe von 320 - 2,5 ng/ml bzw. als Leerwert ohne Standard.

100 µl 1. Antikörper der ermittelten Verdünnung

100 µl markiertes Antigen (Tracer) + 1/200 Kaninchenserum₂

Nach Mischung auf einem VORTEX-Mixer₃ und Inkubation (24^h, R.T.)

100 µl 2. Antikörper der Verdünnung 1:15.

Nach erneutem Mischen und Inkubation (24^h, R.T.) wurde wie oben beschrieben (Zentrifugation, Gamma-Zähler) verfahren. Bei den Analysenbestimmungen wurden statt Standard 100 µl natives oder verdünntes Patientenserum verwandt.

Arbeitsbereich 2,5 - 200 ng/ml

CEA-Radioimmunoassay:

a) Total wie oben beschrieben

b) N-Wert wie Leerwert ohne 1. Antikörper

c) Standard: (geometrische Verdünnungsreihe von 160 - 1,25 ng/ml

100 µl RIA-Verdünnungspuffer

200 µl normales CEA-freies bzw. -armes Humanserum (NHS)

100 µl Standardlösung in Verdünnungspuffer

1 freundlichweise Überlassen von Herrn Prof.Dr.Hammer, Institut für Chirurgische Forschung

2 Fa. Behringwerke, Marburg

3 Fa. Bender & Hobein, München/Dir.: Prof.Dr. Brende

Leerwert:

200 μ l RIA-Verdünnungspuffer

200 μ l NHS

Analysenprobe:

200 μ l RIA-Verdünnungspuffer

200 μ l Analysen-Lösung (Patientenserum nativ oder verdünnt).

Zu Standard, Leerwert und Analysenprobe erfolgte Zugabe von

100 μ l 1. Antikörper in entsprechender Verdünnung.

Nach Vorinkubation (6 - 7^h, 40° C) erfolgte Zusatz von

100 μ l markiertem Antigen (Tracer)

Nach Mischen wie bei der Vorinkubation und Inkubation (16 - 24^h, R.T.).

100 μ l 2. Antikörper in 1:15 Verdünnung.

Bei Berechnung der Konzentrationen der Analysenproben (s. unter Berechnungen) mußten im CEA-RIA die Ergebnisse durch 2 dividiert werden, um die unterschiedlichen Standard- bzw. Analysenvolumina zu korrigieren.

7.2.1.5 Berechnungen

Radioimmunoassay

Die Eingabefolge der Meßdaten beginnt mit den Zählraten für die unspezifische Bindung (N-Wert, Ansatz wie beim Leerwert ohne Zugabe des ersten Antikörpers = unspezifische ¹²⁵J-Antigen-Fällung durch den zweiten Antikörper). Von allen anderen Einzelmeßdaten wird dann der gemittelte N-Wert (counts) abgezogen.

Anschließend erfolgt die Eingabe der Totals (zuge setzte Gesamtaktivität pro Röhrchen), dann der Leerwert-Zählraten (Standard 0 = höchstmögliche spezifische Bindung von ¹²⁵J-Antigen im Assay).

Dieser gemittelte Wert wird als 100% in Beziehung zu allen anderen Zählraten von Standards und Analysenproben gesetzt. Für die Berechnung der Bindungsaktivität im Radioimmunoassay ergibt sich somit die allgemeine Formel:

$$\text{Bindungsaktivität } B/B_o = \frac{B - N}{B_o - N} \times 100 (\%)$$

B: Bound = Zählrate der gebundenen Aktivität der Probe

B_o: = Zählrate der gebundenen Aktivität des Leerwerts (St.0)

N: N-Wert= Zählrate der unspezifisch durch den 2. Antikörper gebundenen Aktivität.

Die so ermittelten Bindungsaktivitäten der Standards in Prozenten des Leerwerts lassen sich in ein Diagramm (x: Logarithmus der Antigenkonzentration, Y: Bindungsaktivität) eintragen und mit einem Kurvenlineal zu einer S-förmigen Standardkurve verbinden. An dieser Bezugskurve können die Bindungsaktivitäten der Analysenproben in die zugehörige Konzentration des Antigens umgewandelt und nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor in die Gesamt-Serumkonzentration umgerechnet werden.

Im Computer-Programm kann man ausser dieser Auswertungsmöglichkeit noch eine andere zeichnerische wie rechnerische Auswertung realisieren. Sie basiert auf der bisher vielfach bewiesenen Voraussetzung, daß für viele RIA-Systeme eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Antigenkonzentration und dem Logit-Wert der Bindungsaktivität besteht. Der Logit-Wert errechnet sich aus dem natürlichen Logarithmus des Quotienten aus der Bindungsaktivität in % und dem von Hundert abgezogenen Bindungsaktivitätswert in %.(145)

$$\text{Logit } l = \ln \frac{p}{100 - p}$$

Logit = l , p = Bindungsaktivität.

Nach dem im Rechenprogramm für jeden Bindungsaktivitätswert angegebenen Logit-Wert für die Standards läßt sich auf speziellem Zeichenpapier (Logit-Log-Papier) eine Gerade konstruieren, die der Beziehung

$$y (\text{Logit}) = A (\text{Ordinatenabschnitt}) + B (\text{Steigung}).$$

$$x (\text{Log conc}) \text{ folgt.}$$

Dieser Schritt läßt sich jedoch auch durch einen zweiten Rechenschritt ersetzen, nach dem im Programm für die Koordinatenpaare der Standards die zugehörige lineare Regressionsgeraden-Gleichung nach dem Prinzip der kleinsten Abweichungsquadrante ermittelt und zusammen mit dem linearen Korrelationskoeffizienten r , der Standardabweichung der Geraden $s_{y.x}$ und den Geraden-Parametern A und B ausgegeben wird. Für jeden einzelnen Logit-Wert einer Analysenprobe berechnet das Programm dann den zugehörigen Logarithmus der Konzentration, der nach Entlogarithmierung und Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor die gesuchte Antigenkonzentration ergibt. Diese Rechenschritte sind im Programm für den programmierbaren Taschenrechner Hp 65 besonders elegant realisiert, wobei nach Eingabe der Zählraten der Analysenproben unmittelbar die Ausgabe der ermittelten Antigenkonzentration erfolgt.

Antikörper-Verdünnungskurve

Die Berechnung der Prozent-Aktivitätswerte zur Konstruktion der Antikörper-Verdünnungskurve läßt sich mit dem gleichen Rechenprogramm ausführen. Abweichend vom RIA-Rechenverfahren wird hierbei nach Eingabe der N- und T-Werte für den Leerwert (Standard 0) noch einmal die Eingabe der T-Werte wiederholt, da ja unterschiedliche Bindungsraten nur durch unterschiedlichen Gehalt des 1. Antikörpers pro Röhrchen bedingt sind. Hier interessiert nur die Angabe der Prozente der Gesamt-Aktivität (100% = zugesetzte Gesamt-Aktivität). Nach Eingabe eines jeden Probenwertes (Zählraten) wird ein Relativwert der Gesamt-Aktivität ausgegeben; die berechneten Bindungsaktivitätswerte lassen sich in einem rechtwinkligen Koordinatensystem mit den Koordinaten x (reziproker Wert der geometrischen Verdünnung $\times 10^{-3}$, äquidistante Abstände zwischen den einzelnen Verdünnungsschritten) und y (relative Gesamt-Bindungsaktivität = $B - N$ auftragen. Man erhält mit steigender Verdünnung des ersten Antikörpers entweder eine zunächst noch steil ansteigende oder mit hoher Bindungsaktivität beginnende Kurve, die nach rechts mit sinkender Antikörperkonzentration allmählich abfällt und asymptotisch ausläuft.

Markierung

Die Berechnung von Teilaktivitäten, der spezifischen Aktivität und der im Radioimmunoassay verwendeten verdünnten Aktivität wurde mit einem speziellen Programm auf dem OLIVETTI P 101 vorgenommen.

Zunächst ermittelt das Programm anhand der eingegebenen Zählraten für die zur Markierung verwandte Gesamt-Aktivität (mCi) und für die verlorene Aktivität (Reaktionsgefäß, Pipettenspitzen) den Aktivitätsverlust in % und mCi sowie die auf die Säule aufgetragene Aktivität in mCi.

1. Säule: Nun können die gemessenen Zählraten für den ersten (Protein- und zweiten (Salz-) Peak mit oder ohne den zwischen, vor oder nachher gemessenen Zählraten eingegeben und berücksichtigt werden. Auf Abruf erfolgt Ausdruck der Gesamt-Countzahl, der relativen Verteilung auf Salz- und Protein-Peak und der im Protein-Peak enthaltenen Aktivität (in mCi).

Nach Eingabe der zur Markierung verwandten Protein-Menge (in μg) erfolgt Ausdruck der nach Verlustkorrektur im Proteinpeak enthaltenen Proteinmenge (in μg), der zugehörigen Aktivität (in mCi) und der sogenannten spezifischen Aktivität in $\text{mCi}/\mu\text{g}$. Bei dem in Rechnung gestellten Aktivitätsverlust blieb die auf der Säule durch Absorption verlorene Aktivität wegen der Schwierigkeit ihrer exakten Ermittlung und ihrer relativen Geringfügigkeit unberücksichtigt. Radioaktivität und Proteinmenge der für den RIA verwandten Fraktionen der 2. Säule (enthält nur proteingebundene Aktivität) wurden über die Gesamtaktivität der Säulenfraktionen und die spezifische Aktivität des Tracers ermittelt.

Ein zweiter Programmteil diente der Ermittlung der für den Radioimmunoassay angestrebten Aktivität pro Röhrchen (Total). Nach vorsichtiger Vorverdünnung der von der 2. Säule für den Assay ausgewählten Fraktionen (z.B. 1:40) wurde eine kleine (20 μl) unter normalen RIA-Zählbedingungen (Buffy-Zähler, Zählzeit 2 Minuten) vorgemessen. Über die Eingabe dieser Zähl-

rate einschließlich der verwandten Flüssigkeitsmenge und der vorhandenen vorverdünnten Gesamttracermenge in μl und der Gesamt-Proteinmenge (in μg) wird die in der verdünnten Gesamtfraktion vorhandene Gesamtzählrate ermittelt und ausgegeben. Nach Auswahl und Eingabe der gewünschten Zählrate pro Röhrchen erfolgt Ausdruck der relativen Zählrate und der der gewählten Zählrate entsprechenden Proteinmenge in μg und Flüssigkeitsmenge in μl . Diese Flüssigkeitsmenge muß dann auf die im Ansatz erforderliche Tracer-Flüssigkeitsmenge von 100 μl weiterverdünnt werden. Für die CEA-Bestimmung wurde ein etablierter CEA-Immunoassay verwandt (112).

Für die AFP-Bestimmung wurde ein ebenfalls nach dem oben angegebenen Verfahren etablierter Assay verwandt.

Beide RIA's waren Doppelantikörpertests (1. Antikörper-Kaninchen, 2. Antikörper-Ziege) für direkte Serumbestimmungen. Beim CEA-Test wurde dem Standard noch CEA-freies Serum zugemischt. (Arbeitsbereich 2,5 - 160 ng/ml).

Beim AFP-Assay wurde statt Normalserum 10% Pferdeserum im RIA-Puffer verwandt (Arbeitsbereich 13 - 200 ng/ml).

Die Intraassayvariation lag für beide RIA's unter 5%, die Interassayvariation lag unter 15%.

7.2.1.6 Immunoradiometrischer Assay (Irma)

Prinzip:

Nach dem Prinzip der nicht kompetitiven Bindung erlaubt dieser Test die in vitro-Bestimmung von Ferritin im Serum. Es handelt sich um einen Two-site solid phase-Assay des Sandwich-Typs. Die Basis als feste Phase bildet eine Kunststoffkugel, an die der Anti-Ferritin-Antikörper haftet.

Es erfolgt die Inkubation der Antikörper-Phase mit Standards- und Serumproben, die Ferritin enthalten. Dabei wird das Ferritin aus der Lösung quantitativ über den Antikörper an die feste Phase gebunden. Durch die Reaktion mit ^{125}J -markiertem Anti-Ferritin-Antikörper kann die Menge des an die feste Phase gebundenen Ferritins bestimmt werden. Dieser sich bildende Antikörper-Ferritin ^{125}J -Antikörper-Komplex wird Sandwich genannt. Ein Maß für die vorhandene Menge Ferritin ist die an die feste Phase gebundene ^{125}J -Aktivität.

In diesem Assay kommen Anti-Ferritin-Antikörper zweier Tier-spezies, die mit verschiedenen Organ-Isoferritinen erzeugt wurden zur Anwendung.

Feste	Anti-Leber	Serum	Anti-Plazenta
Phase	Ferritin	Ferritin	Ferritin
	Schaf		Hase

Der Assay umfaßt den Bereich von 0 - 400 ng Ferritin/ml.

Die maximale Genauigkeit liegt bei ca. 100 ng Ferritin/ml, der optimale Meßbereich zwischen ca. 15 - 400 ng Ferritin/ml.

Die Nachweisgrenze beträgt 5 ng/ml.

Beim Aufstellen des Assays wurde nach den Angaben des Herstellers¹ verfahren.

7.2.2 Präparative Verfahren:

7.2.2.1 Gewebeextraktion

Bei der Extraktion kamen zwei verschiedene Methoden zur Anwendung:

Bei der salinen Extraktion wurden die Tumoren und das Normalgewebe in einer Köttermann-Labortiefkühltruhe² bei - 20° C und am Vorabend der Verarbeitung in einem Kühlraum von 4° C stufenweise aufgetaut. Das aufgetaute Gewebe wurde bei Raumtemperatur mit einem doppelschneidigen Wiegemesser grob zerkleinert und unter Zusatz von destilliertem Wasser 1:10 000 Cialit im Verhältnis 1:2 in einem Multimix³ weiterverarbeitet. Bei der Perchlorsäureextraktion war die Vorbehandlung bis zur Stufe der Homogenisation die gleiche. Danach wurde 1,2 molare Perchlorsäure im Verhältnis 1:1 zugefügt und der Gewebebrei bei Raumtemperatur 30 Minuten ständig gerührt.

1 Behringwerke AG
RIA-gnost Ferritin

2 Fa. Köttermann, Hämigsen, Hann
3 Fa. Braun, Melsungen

7.2.2.2 Homogenisation

Der Gewebebrei wurde in 400 ml-Portionen aufgeteilt und im Kühlraum (4° C) in einem maschinellen Homogenisator (Virtis 60 Homogenizer)¹ mit rhomboiden Schermessern bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 15 000 - 20 000 UpM homogenisiert. Zum Schluß wurde mit einem Homogenisator nach Potter-Elvehjem² im 60 ml-Zylinder unter Verwendung eines teflonbeschichteten Pistills unter motorbetriebenen Druck-Saug-Bewegungen³ (Typ 53 022 bis 400 UpM) eine feindisperse Zerkleinerung vorgenommen.

7.2.2.3 Zentrifugation

Nach einer Vorzentrifugation bei 4° C und 1000 g für eine Stunde und einer weiteren bei 50 000 g (4° C, 1 Stunde), wobei das Präzipitat jeweils verworfen wurde, kamen beide Extrakte zur Dialyse.

7.2.2.4 Dialyse

Dem erhaltenen Gewebebrei wurde die gleiche Volumenmenge Coons-Puffer zugesetzt. Anschließend wurde er in Dialyseschläuche (Kaliber 38⁴ von 50 cm Länge gefüllt und für 48 Stunden gegen fließendes Leitungswasser dialysiert (R.T.).

1 Fa. Leuco, Haan, Rld.

2 Fa. Braun, Melsungen

3 Fa. Christ, Osterode

4 Fa. Kalle, Wiesbaden

7.2.2.5 Filtration-Einengung

Das Präzipitat wurde verworfen, der Überstand in einem Vorratsgefäß (20 l) von 4 l Kapazität gesammelt und mittels eines angeschlossenen Amicon-Systems über eine Ultrafiltrationszelle (UF 400, und einer Ultrafiltrationsmembran PM 10 (Ø 72 mm, auf etwa die Hälfte eingeengt. Diese mehrere Tage dauernde Konzentration fand im Kühlraum bei 4° C statt. Zum Schutz vor zu starker Einengung wurde ein Sicherheitssystem (Endpoint-Controller EC 20) angeschlossen. Danach wurde eine weitere Dialyse unter Zusatz von 10 Volumeneinheiten destillierten Wassers durchgeführt und eine Endkonzentration bis zu einem Volumen von 50 - 60 ml vorgenommen. Dieses Konzentrat wurde nochmals für eine Stunde (4° C; 10 000 UpM) zentrifugiert. Der Überstand wurde über ein Druckfiltrationsgerät SM 16223¹ (Kapazität: 20 ml; N₂-Druck bis 20 kg/cm²) unter Verwendung von Glasfaservorfilter und Filtern der Stärke 3,0, 1,2, 0,6, 0,2 µ gefiltert.

7.2.2.6 Lyophilisation

Die Extraktion schloß mit einer Lyophilisation ab. Dabei wurden die Gewebsextrakte in Portionen mit einem Volumen von ca. 100 - 150 ml in Glasschalen gefüllt und in eine Lyophilisier-Einrichtung der Fa. Christ (Typ 150)² gestellt. Dieser Vorgang dauerte zwischen 10 und 24 Stunden. Das lyophilisierte Material wurde gewogen, in Erlenmeyerkolben gesammelt und im Kühlschrank bis zum weiteren Gebrauch aufbewahrt.

1 Fa. Amicon, Oosterhout, Holland

2 Fa. Satorium-Membranfilter-Ges., Göttingen

3 Fa. M. Christ, Aichach-Obernbernabach

7.2.2.7 Chromatographie

7.2.2.7.1 Gelfiltration (Tab. 8 a)

Um die Tumorextrakt- und Normalgewebsextrakt-Proteine nach ihrem Molekulargewicht zu trennen, wurden zwei verschiedene Sepharose- bzw. Sephadex-Typen¹ verwendet.

Sepharose 6 B ist ein perlförmiger Agarose-Typ mit 6%igem Agarose-Gehalt und einer Perlgröße von 40 - 210 μ und einer Protein-Ausschlußgrenze von 4×10^6 MG.

Zur Auftrennung des Ovarialtumorgesamtextraktes wurde Sepharose 6 verwandt. Die Säulengröße betrug 2,5 x 90 cm; als Elutionspuffer wurde 0,05 M Tris-HCl pH 6,0 in 0,1 NaCl und 0,02%igem Na-azid Zusatz verwandt.

Sephadex G ist ein kugelförmiges polymerisiertes Dextran-Gel. Je nach G-Typ werden unterschiedliche Fraktionsbereiche der Proteine getrennt.

Die Säulengröße für Sephadex G 200 betrug 2,5 x 80 cm; als Elutionspuffer kam der schon oben beschriebene Tris-HCl-Puffer zur Anwendung. Aufgetragen wurden Sammelfraktionen von Sepharose 6 B- und Tumorgesamtextrakt.

Sephadex G 100 diente zur Folgereinigung von AFP-haltigen Fraktionen (Säulengröße 1,5 x 85 cm, Puffer: Tris-HCl), zur Endreinigung des 125 Jodmarkierten AFP wurde eine Säulengröße von 1,5 x 35 cm verwandt; als Elutionspuffer diente 0,07 M Veronal-Puffer pH 8,6.

¹ Fa. Serva, Heidelberg

Sephadex G 50 diente zur Erstreinigung von ^{125}J -markiertem AFP und CEA (Elutionspuffer 0,07 M Veronal-Puffer). Unter ständiger Absorptionsmessung¹ bei 254 bzw. 280 nm wurde das aufgetragene Material eluiert und in 5 ml Portionen mittels eines Fraktionskollektors² gesammelt. Gemäß der Chromatographiekurve wurde dann der Inhalt der Einzelreagenzgläser zu Fraktionen zusammengesüttet, konzentriert und in (0,5 - 1 ml) Portionen bei -70°C aufbewahrt.

7.2.2.7.2 DEAE-Zellulose (Tab. 8 a)

Um reine IgG-Fraktionen von brauchbaren Antiseren zu gewinnen, wurde die Zellulose-Anionenaustauschchromatographie verwandt. DEAE-Zellulose wurde in 0,01 M Na-Phosphatpuffer pH 8,0 mit 0,02% Na-Azid-Zusatz mit leichtem Druck (Preßluft) unter kontinuierlicher Drucksteigerung von 0,5 - 2 kg/cm^2 in Säulen von 2,5 x 38 cm gepackt. Das Serum wurde, bevor es aufgetragen wurde, gegen Startpuffer dialysiert. Das Einsickern des aufgetragenen Materials wurde durch leichten Druck (Preßluft) beschleunigt.

Unter ständiger Absorptionsmessung bei 254 bzw. 280 nm wurde das eluierte Material in Fraktionen von 6 ml mittels eines Fraktionskollektors gesammelt.

Nach Elution des ersten Hauptpeaks wurde der Grenzpuffer (0,5 M- Na-Phosphatpuffer pH 4,5) über einen zweiten Behälter (Erlenmeyer-Kolben 500 ml) und einem Bodenabfluß in dem ersten Behälter (1 l-Rundkolben mit 0,01 M Na-Phosphatpuffer) nach

1 Uvicord I bzw. II Fa. LKB, Bromma, Schweden

2 Ultra Rac Frakt Koll. Fa. LKB

dem Prinzip kommunizierender Röhren angeschlossen. Mittels einer Schlauchpumpe¹ unter Bildung eines kontinuierlichen konvexen ansteigenden Molaritäts- und absteigenden pH-Gradienten floß der Puffer über die Säule. Nach den Hauptpeaks der Chromatographie-Kurve wurden die Einzelreagenzgläser zu Fraktionen zusammengeschüttet und konzentriert. Nach Testung wurden sie in 0,5 - 1 ml Portionen aufgeteilt und bei -70°C gelagert.

7.2.2.7.3 Immunabsorption (Affinitätschromatographie) (Tab. 8 b)

Reinste Fraktionen von DEAE-Cellulose-Säulen wurden zur Herstellung einer CN-Bromid-aktivierten Säule verwendet, um reines Antigen zu erhalten.

Das Prinzip einer CN-Bromid-aktivierten Sepharose 4 B² besteht darin, daß aktivierte CN-Br-Gruppen mit den Hydroxyd-Gruppen der Sepharose reagieren und zyklische und azyklische Imidokarbonat-Gruppen bilden (7). Bei Reaktion mit Proteinen gehen diese Imidokarbonat-Gruppen mit den primären Amino-Gruppen der Proteine eine kovalente Bindung ein. Gibt man nach Bindung des gewünschten Proteins - hier gereinigtes Anti-CEA-IgG, Anti-Ferritin-IgG, Anti-AFP-IgG, Anti-OCAA₃-IgG u. Anti-OCAA₄-IgG vom Kaninchen und Blockierung der restlichen aktiven CnBr-Gruppen weitere Proteine über die Säule, so gehen diese bei Elution im niedermolaren Milieu (PBS = 0,02 M Na-Phosphat + 0,15 M NaCl, pH 7,4 + 0,02% NaN₃) nur dann eine Bindung ein, wenn es sich bei ihnen um homologe Antigene des fixierten Antikörpers handelt.

1 Vario-Perpex-Schlauchpumpe

2 Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden

Um die Säule von nichtimmunologisch gebundenen Proteinen zu reinigen, wird mit dem vierfachen Säulenvolumen PBS nacheluiert. Durch anschließenden Pufferwechsel in hochmolares Milieu (PBS + 2,0 M KSCN) läßt sich die AK- AG-Bindung wieder lösen, wobei das spezifische Antigen in reiner Form dissoziiert. Zum Herstellen und Betreiben der Säule wurde nach Angabe des Herstellers verfahren.

7.2.3 Herstellung von Antiseren

7.2.3.1 Immunisierung

Es wurden insgesamt 25 weibliche Kaninchen (Tab. 9) (weiße Neuseeländer) immunisiert. Immunisiert wurde z.B. mit salinem und PCA-Gesamtextrakt und Einzelfractionen der Seph 6 B/G 200 Säulen. Es wurde nach dem Schema von HIJMANS et al. (83) in leicht abgewandelter Form vorgegangen:
Erstimmunisierung mit ca. 100 - 200 µg Antigen in 1 - 2 ml. phys. NaCl gelöst und mit gleichen Volumen kompl. Freundschens Adjuvans¹ gemischt. Die Suspension wurde in alle vier Fußsohlen (0,2 - 0,3 ml/Fs) und der Rest in den Rücken appliziert. Nach 3 Wochen erfolgte zweimal pro Woche eine i.v. Immunisierung über drei Wochen mit steigenden Mengen einer KAl-präzipitierten Ag-Lösung folgender Herstellung

- 2,5 ml gepuff. phys. NaCl-Lös. mit 200 - 300 µg Ag
- + 1,15 ml 1 N Bikarbonatlösung
- + 2,5 ml 10% KAl-Sulfatlösung.

1 Fa. DIFCO Laboratories, Detroit Mich. USA

Diese Suspension wurde über Nacht bei 4° C inkubiert und dann für 30 Minuten bei 3000 UpM (1000 g) zentrifugiert. Das Präzipitat wurde nach Dekantierung des Überstandes in 4 ml gepufferter phys. NaCl-Lösung gelöst und in 0,5 ml Portionen eingefroren. Die i.v. Immunisierung über drei Wochen wurde wie folgt, vorgenommen:

1. Woche	0,05 ml	-	0,1 ml
2. Woche	0,1 ml	-	0,2 ml
3. Woche	0,2 ml	-	0,4 ml

Eine Woche nach der letzten i.v.-Applikation wurde dem Kaninchen eine Blutprobe entnommen.

Diese wurde 1 Std. bei 37° C und über Nacht bei 4° C inkubiert, dann zentrifugiert (3000 UpM für 15 Min.). Ließen sich in dem dekantierten Serum nach Testung mittels Ouchterlonytechnik neben unspezifischen genügend spezifische Antikörper nachweisen, wurde das Kaninchen nach einer weiteren Woche entblutet. Waren nicht genügend spezifische Antikörper nachweisbar, wurde noch für drei Wochen mit einwöchentlicher Injektion 0,4 - 0,6 ml Ag-Suspension i.v. immunisiert, dann die Immunisierung abgebrochen.

7.2.3.2 Absorption

Das erhaltene Serum wurde mit gewaschenen A/B Erys für eine Stunde bei 27° C inkubiert, zentrifugiert und dekantiert. Die Absorption wurde so lange fortgesetzt, bis mikroskopisch keine Agglutinate mehr sichtbar waren. Eine weitere Absorption

erfolgte mit Normalserum (lyophilisiert) und Normalovarialgewebsextrakt. Die Menge des zugesetzten Normalserums und normalen Ovargewebes richtete sich nach der Vortestung im Ouchterlony-Test (Vorabsorption mit ermittelten Proteinmengen).

7.2.3.3 Reinigung der Immunsereen

Die absorbierten Antiseren wurden zur Gewinnung von reinen IgG-Fractionen auf eine DEAE-Cellulose-Säule aufgetragen. Zuerst wurde das Serum in Dialyseschläuchen gegen Startpuffer (0,01 M-Na-Phosphat-Puffer pH 8,0) für ca. 24 h bei 4° C dialysiert und für 30 Minuten bei 10 000 UpM zentrifugiert. Danach erfolgte die Chromatographie auf DEAE-Zellulose wie bei 7.2.2.7.2 beschrieben. Die eluierten Fractionen wurden geprüft, konzentriert, gepoolt und bei -70° C aufbewahrt. Als Referenzseren dienten: Anti-CEA (Wastl , Tom-schwache Reaktion gegen NCA); Anti-AFP; Anti-Ferritin; Anti-Lactoferritin; verschiedene Antiseren gegen Humanproteine.

7.2.4 Zentrifugation

Vor Bestimmung der Serumkonzentrationen von AFP, CEA, Ferritin, OCAA₃ bzw. OCAA₄ wurde das Nativblut bei 1 000 g (3 000 UpM) in einer Heraeus-Christ-Zentrifuge Typ KJ 31¹ für 10 bis 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und entweder gleich zum Test herangezogen oder bei -40 bis - 70° C eingefroren.

1 Deutsche Pharmedia GmbH, Freiburg Br.

7.2.5 Ergebnisse

7.2.5.1 Gewebeverarbeitung

Nach dem auf Abb. 2 a dargestellten Schema wurden insgesamt vier Tumorextraktionen und zwei Normalgewebsextraktionen (Tab. 6) vorgenommen. Bei der ersten Extraktion wurde eine Hälfte nach der salinen und die andere nach der Perchlorsäureextraktionsmethode verarbeitet.

Da sich bei der Prüfung der lyophilisierten Extrakte im Ouchterlony-Test sowohl im salinen als auch im Perchlorsäureextrakt (ausgenommen Ferritin) die tumorassoziierten Antigene nachweisen ließen, wurden die folgenden Extraktionen nur noch nach der Perchlorsäureextraktionen vorgenommen. Die beiden Normalgewebsextraktionen erfolgten nach der salinen Methode. Wie aus Tabelle 6 hervorgeht, beträgt die erhaltene lyophilisierte Tumorextraktmenge 1/100 des Tumornaßgewichtes bei der salinen Methode und ca. 1/500 bei der PCA-Extraktion. Die Extrakte wurden OES (saline Extraktion), OEP (Perchlorsäureextraktion) und ONES (saline Normalgewebsextraktion) benannt.

7.2.5.2 Elektropherogramm

In Abbildung 3 sind zwei typische Elektropherogramme eines salinen und eines Perchlorsäureextraktes gezeigt. Dabei weist das Elektropherogramm des salinen Extraktes große Ähnlichkeit mit dem des Humanserums auf, wobei die Albuminfraktion etwas niedriger, die beta-Fraktion etwas höher ist. Im Elektrophero-

gramm des Perchlorsäureextraktes lassen sich keine Ähnlichkeiten mit dem des Humanserums nachweisen.

In der Doppelimmunodiffusion (Ouchterlony) wurden im salinen Extrakt als Verunreinigung folgende Serumproteine nachgewiesen: Albumin, mehrere α_1 - und α_2 -Globuline sowie α -1-Glykoprotein, Antitrypsin, Haptoglobin, weiter Transferrin und IgG. Im Perchlorsäureextrakt fanden sich nur Albumin, α -1-Glykoprotein und α -1-Antitrypsin.

7.2.5.3 Gelfiltration

Zur weiteren Reinigung der Tumorextrakte wurden OES-Gesamtextrakt (100 - 150 mg) und OEP-Gesamtextrakt (150 mg) auf Sepharose-6 B- und Sepharose G 200-Säulen aufgetragen. Als Elutionspuffer diente 0,05 molarer Tris-HCl-Puffer mit 0,1 n NaCl und 0,02% NaN₃, pH 6,0. Die in Abbildung 4 a u. 4 b wiedergegebenen Chromatogramme zeigen typische Verlaufskurven beider Extrakte. Es lassen sich bei Gelfiltration von OES über eine Sepharose-6 B-Säule zwei gut voneinander abzugrenzende Fraktionen erkennen. (6 B I u. 6 B II, bei OEP sind es insgesamt vier Fraktionen (6 B I - IV).

Die weitere Auftrennung der OES-Sammelfraktion über eine Sephadex G 200-Säule ergibt vier Fraktionen (G 200 I - IV) (siehe Abb. 4 a), bei analoger Filtration von OEP gesamt lassen sich fünf Fraktionen unterscheiden (OEP G 200 I - V). Zur Abtrennung der in OES enthaltenen höhermolekularen Proteine er-

wies sich die Vorschaltung einer Sepharose- 6 B-Säule als nützlich, während bei OEP eine Sephadex- G 200-Säule ausreichend war.

7.2.5.4 Antigene

7.2.5.4.1 OCAA-1 (Ferritin)

Mit den Antiseren Nr. 2, 5 und 9 konnte gegen OES eine übereinstimmende Präzipitationslinie nachgewiesen werden, die im Vergleich mit einem Referenz-Anti-Ferritin-Serum eine immunologische Identitätsreaktion bzw. eine partielle Identitätsreaktion (Nr. 9 Franzl) aufwies (Abb. 5 a). Daraus folgt, daß Antiserum Nr. 9 ("Franzl") neben übereinstimmenden noch mindestens eine zusätzliche Antigen-Determination eines ferritin-ähnlichen Antigens in OES erkannte, d.h., daß es sich hier um ein Isoferritin handelte, das als OCAA-1 bezeichnet wurde. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung von OES war OCAA-1 nur in Fraktion G 200/I nachweisbar, nicht aber in anderen G 200-Fractionen oder OEP (Abb. 5 b). Da nur normalserumabsorbiertes Anti-OCAA-1-Serum noch mit normalem salinen Ovarialgewebsextrakt (ONES) reagierte, wurde eine entsprechende zusätzliche Absorption mit ONES durchgeführt; wie aus Abb. 5 c hervorgeht, war danach mit Antiserum Nr. 5 die Präzipitationslinie gegen ONES stark abgeschwächt bis aufgehoben, während sie gegen OES bzw. OES G 200/I unverändert bestehen blieb. Aufgrund seines Trennungsverhaltens in der Gel-filtration weist OCAA-1 ein Molekulargewicht im Bereich zwischen 10^5 - 10^6 Daltons auf.

7.2.5.4.2 OCAA-2 (CEA)

Mit einem Referenz-Anti-CEA-Serum (Tom¹) konnte mittels Immundiffusion CEA nicht in OEP I, OEP III oder OES, aber in OEP II nachgewiesen werden (Abb. 5 e). Nach Gelfiltration von OEP II war es nur in Fraktion 6 B II und III, nicht in 6 B I oder IV nachweisbar. Die im Ouchterlony-Ansatz von Abb. 5e zusätzlich nachweisbare zweite Präzipitationslinie, die zuerst im Ansatz gegen 6 B II₁ auftritt und bis 6 B III₂ zu verfolgen ist, entspricht dem non-specific crossreacting antigen (NCA), da das Referenz-anti-CEA-Serum nicht CEA-spezifisch war. Ein gegen OEP II 6 B II hergestelltes Antiserum (Nr. 10) wies nach NS/AB-Erythrozyten-Absorption und Isolierung der IgG-Antikörper ebenfalls diese beiden Linien auf. Durch weitere Absorption an einer CNBr-aktiv Seph. 4 B-Säule mit angekoppeltem Lungengewebeextrakt (PCA) konnten die beiden Antikörper-Populationen isoliert werden, so daß neben dem spezifischen Anti-CEA-Serum Nr. 10 CLE/1 -CCEA/3, Abb. 6 oben links) noch eine Fraktion mit kreuzreagierenden Antikörpern gegen gemeinsame Antigen-Determinanten von CEA und NCA (Nr. 10 CLE/3, Abb. 6 unten links) erhalten wurde.

Das in OEP II gefundene CEA-ähnliche Antigen wurde als OCAA-2 bezeichnet. Nach seinem Gelfiltrationsverhalten wurde es im Molekulargewichtsbereich um 2×10^5 Daltons eluiert. In der Immundiffusion und CAF-Elektrophorese zeigte es β -Mobilität. OCAA-2 ließ sich durch Affinitätschromatographie an CNBr-aktiv. Sepharose 4 B

1 freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. A.A. Hirata, Abbott Laboratories, Chicago, USA

mit angekoppeltem Anti-CEA-IgG (Nr. 18) isolieren (Abb. 7). Neben OEP II wurde CEA auch aus einem Perchlorsäure-Extrakt von Ascites einer Patientin mit Ovarialkarzinom isoliert. Das gereinigte OCAA-2-Präparat (als CEA-OV bezeichnet) zeigte im Vergleich zu anderen organ-bezogenen Tumor-CEA-Präparationen (CEA-CO-Colonkarzinom-CEA; CEA-PA-Pankreaskarzinom-CEA; CEA-MT = Mammakarzinom-CEA; CEA-BC = Bronchialkarzinom-CEA) eine immunologische Identitätsreaktion (Abb. 8 a, b, c).

Eine gereinigte OCAA-2/CEA-OV-Präparation wurde zur Entwicklung eines CEA-OV-Radioimmunoassays verwandt. Abb. 9 gibt die Gel-filtrationstrennung des markierten J-125-Tracers wieder. Nach Auftrennung des 1. Peaks der Sephadex G 50 fine-Säule (nur jodmarkiertes Protein) auf einer Sephadex G 200-Säule waren 42% nach Vortestung in der Antikörper-Verdünnungsreihe als Tracer verwendbar und wiesen eine spezifische Aktivität von 7,9 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ Protein auf.

Abb. 10 zeigt Antikörperverdünnungskurven des CEA-OV- und eines Referenz-CEA-CO-Tracers mit zwei verschiedenen Anti-CEA-OV-Seren (Nr. 383/485¹), und unseres Referenz-Anti-CEA-CO-IgG (Xaver). Die Kurvenzüge der verschiedenen Antiseren weisen unabhängig vom Tracer ähnliche, fast parallele Verläufe auf. Die höchsten Bindungskapazitäten zeigten sich bei Verwendung des CEA-CO-Tracers für alle Antiseren (Anti-CEA-CO-IgG hier nicht abgebildet) bei einer Verdünnung der Anti-CEA-OV-Seren um 1/400 mit Bindungswerten um 80%. Mit Tracer CEA-OV zeigte Anti-CEA-CO-IgG die höchste Bindung von 75% bei einer Verdünnung von 1/4000, wobei

¹ freundlicherweise von Prof. Burtin, Villejuif, Frankreich zur Verfügung gestellt.

die entsprechenden Raten für die Anti-CEA-OV-Seren bei 62-68% mit einer Verdünnung zwischen 1/300 und 1/400 lagen. Für die 50%-Bindung lagen die Verdünnungen bei Tracer CEA-CO bei 1/90000 (Anti-CEA-CO-IgG) bzw. 1/6000 (Nr. 389/485), bei Verwendung von Tracer CEA-OV bei 1/50 000 bzw. 1/2000.

In den nächsten Abbildungen (11, 12) sind die Standard-Inhibitionskurven nach dem Logit-Log-Auswerteverfahren als Regressionsgeraden unter Verwendung verschiedener Tracer (CEA-CO⁺, CEA-OV⁺), Antikörper (Anti-CEA-CO-IgG Xaver, Anti-CEA-OV Nr. 485) und Standards (CEA-CO, CEA-OV) wiedergegeben.

Aus den Abbildungen geht hervor, daß zwischen den Inhibitionskurven beider organbezogener Standards kein signifikanter Unterschied besteht (praktisch gleiche A- und B-Werte bei Verwendung gleicher Antikörper und Tracer). Ferner besteht ein mittlerer signifikanter Unterschied der B-Werte (Steigungen) bei Verwendung unterschiedlicher Antikörper aber gleicher Tracer. Nur bei Verwendung unterschiedlicher Tracer besteht ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den B-Werten: bei Tracer CEA-OV lagen die B-Werte (Steigung der Regressionsgeraden) und A-Werte (y-Achsenabschnitt) signifikant höher ($p \ll 0,001$; CEA-OV: $\bar{B} = -2,93 \pm 0,08$, $n = 4$; CEA - CO: $\bar{B} = 2,05 \pm 0,04$, $n = 4$). Die einzelnen Parameter sind in Tab. 10 zusammengestellt und in Tab. 11 die B-Werte der einzelnen Geraden untereinander geprüft.

Aus den Befunden kann gefolgert werden, daß bei Verwendung organbezogener CEA-Standards, -Antikörper und -Tracer der geringste Einfluß auf das RIA-System durch den Standard, ein größerer durch den Antikörper und der größte Einfluß durch

den verwendeten Tracer ausgeübt wird. Da die B-Wertschwan-
kungen auch beim über jahrelange Markierungen hinweg be-
nutzten Referenz-CEA-CO-Tracer von Markierung zu Markierung
auftraten, ist dieser Umstand hauptsächlich auf den schädigen-
den Einfluß von Radioaktivität und/oder oxidierenden/reduzieren-
den Substanzen bei der Markierung zurückzuführen und weniger auf
immunologische Unterschiede, die ja aufgrund der Immunodiffusions-
Untersuchungen (Abb. 8) und der weitgehenden immunologischen
Identität verschiedener CEA-Präparationen nur geringerer Natur
(Mikro-Heterogenität) sein können.

7.2.5.4.3 OCAA-3

Schon in Abb. 5 c, in der Antiserum Nr. 5 (Balduin) in der
Immunodiffusion gegen OES und OES G 200/I eine Präzipitations-
linie bildete, die als OCAA-1 (Ferritin) identifiziert werden
konnte, zeigte das gleiche Antiserum eine zweite Präzipitations-
linie gegen OEP I und OEP I G 200/I, die mit der zuerst be-
schriebenen Linie eine immunologische Nicht-Identitätsreaktion
(Kreuzung der Linien) aufwies. Die Nähe der Präzipitationslinie
in Abb. 5 c zu den Antigenreservoirs (OEP I G 200/I bzw. OEP I)
und ihre gebogene Verbindung zwischen diesen beiden Reservoirs
weisen das Antigen, das als OCAA-3 bezeichnet wurde, als ein
hochmolekulares Antigen aus. Die stärkste Reaktion gegen OCAA-3
wies Antiserum Nr. 3 (Gundula), das gegen OEP I-Gesamtextrakt
hergestellt worden war, auf; diese Präzipitationslinie verband
sich völlig mit der von Antiserum Nr. 5 (Balduin). Da dieses

Antiserum jedoch gegen OES - G 200/I hergestellt worden war, folgt, daß OCAA-3, wenn auch in deutlich geringerer Konzentration (d.h. im Ouchterlony nicht sichtbar) in OES vorhanden sein muß. Gemäß seinem Gelfiltrationsverhalten handelt es sich beim OCAA-3 ebenfalls um ein hochmolekulares Antigen (Mol.Ber. um $> 10^6$), da es in der Sephadex G 200-Filtration im Ausschlußvolumen erscheint. Abb. 13 gibt in einer anderen Zusammenstellung den oben beschriebenen Sachverhalt wieder. Hier zeigt sich auch eine schwach angedeutete Präzipitationslinie gegen OCAA-3 in Fraktion OES G 200/I (links unten). Immunelektrophoretisch zeigte OCAA-3 β -Mobilität und wanderte nur wenig aus dem Antigenreservoir anodenwärts (Abb. 14). Nach Abb. 15 war OCAA-3 in OEP-I mittels Immunodiffusion auch mit Antiserum Nr. 10 (gegen OEP II 6 B II) und Nr. 15 (Anti-OEP III) nachweisbar, obwohl OEP III im Ouchterlony (ebenso wie OEP II) negativ blieb. Weiterhin zeigte auch ein Antiserum gegen normalen Colongewebs-Extrakt (PCA, Anti-NE, Max) eine Reaktion gegen OCAA-3 (neben einigen Präzipitationslinien gegen niedermolekulare Antigene wie auch mit Antiserum Nr. 15); diese Linie war jedoch nicht im Ansatz gegen normalen Lungen-PCA-Extrakt zu erkennen. Weitere Immunodiffusions-Untersuchungen zeigten, daß OCAA-3 nicht identisch war mit AFP, CEA, Ferritin, Lactoferrin, Lysozym, β_1 -SP1, α_2 -PAG, anti-Chymotrypsin, Fibrinogen oder den meisten zu testenden Serumproteinen. Weitere Isolierungen von OCAA-3 scheiterten an dem begrenzten Untersuchungsmaterial und der Tatsache, daß OEP II und OEP III

dieses Antigen in nur sehr geringer Konzentration enthielten. Erst OEP IV erwies sich wieder reich an OCAA-3, war dafür CEA-negativ (Abb. 16). Mit OCAA-3 angereicherte Fraktionen (OEP IV 6 B/I) wurden affinitätschromatographisch mittels einer CNBr-aktiv. Seph 4 B-Säule mit angekoppeltem Anti-NE-IgG weiter verarbeitet und die gereinigte Fraktion CNE/3 noch an einer Antihumanserumprotein-Säule absorbiert (C 27). Das so gereinigte OCAA-3 wurde zur Herstellung eines hochpotenten Anti-OCAA-3-Serums und als Tracer für die Entwicklung eines Radioimmunoassays verwandt. Abb. 17 zeigt eine Immunodiffusions-Untersuchung von NS/AB-absorbiertem Antiserum Nr 31 gegen OEP IV-Extrakt und Lungenextrakt (LE) (oberes Reservoir).

Neben der deutlich ausgeprägten Linie gegen OCAA-3 ergab sich noch eine Präzipitatslinie gegen LE, die erst nach Absorption mit LE entfernt werden konnte, wobei die Reaktion gegen OCAA-3 erhalten blieb (zentrales Reservoir). In Abb. 18 ist die immunologische Identitätsreaktion zur Erkennung von OCAA-3 mit den verschiedenen Antiseren einschließlich Nr. 31 unter Verwendung des OEP G 200/I Extraktes (zentrales Reservoir) wiedergegeben. Antiserum Nr. 31 wurde dabei über eine CNBr. aktiv. Sepharose 4 B-Säule mit angekoppeltem Lungengewebs-Perchlorsäure-Extrakt absorbiert (Abb. 19). Abb. 20 gibt die Prüfung des gereinigten OCAA-3-Antigens im Ochterlony-Test im Ansatz gegen spezifische Anti-OCAA 3- + -Seren und verschiedene Antiseren gegen normale Serumproteine wieder. Man erkennt - wenn auch etwas schwach - die oberhalb des zentralen Reservoirs aufgetretene gebogene

Präzipitationslinie gegen ein direkt für die Markierung benutztes Aliquot (ca. 20 µg/20 µl).

Radiojodmarkierung

In Abb. 21 ist die Gelfiltrations-Reinigung des OCAA-3-Tracers eines Markierungs-Experimentes wiedergegeben. 51% der zur Markierung verwandten Radiojodmenge (300 µCi NaJ¹²⁵) wurden in das Protein eingebaut und nach Isolierung vom freien Jod (Sephadex G 50 fine) über eine Sephadex G 200-Säule weiter fraktioniert. Dabei ergaben sich zwei Peaks, von denen nur der erste immunologisch aktives Material enthielt. Davon wurden die zentralen Fraktionen (Nr. 23 - 24, 30% der Aktivität der 2. Säule) vereinigt, nach Vortestung mit Antikörper-Verdünnungskurven zu einer gebrauchsfertigen Tracer-Lösung (ca. 25 000 counts pro Minute) verdünnt und in 10 ml-Portionen eingefroren.

Die spezifische Aktivität des Tracers betrug 8,7 µCi/ug OCAA-3. Abb. 22 zeigt den typischen Kurvenverlauf der Anti-OCAA-3-Antikörper-Verdünnungskurve von 2 Anti-OCAA-3-Antiseren (Nr. 3, 17). Beide Antiseren ergaben mit Tracer OCAA-3 2/81 höchste Bindungsraten von 75 - 80% bei einer Verdünnung von 1/1000. Die 50%-Bindungspunkte wiesen Verdünnungstitern von 1/8000 bzw. 1/12 000 auf (unspez. Bindung bei 10%). Aufgrund der Antikörper-Bindungskurve wurde für den Radioimmunoassay (Standard-Inhibitionskurve) eine 1. Antikörper-Verdünnung von 1/40 000 gewählt. Der 2. Antikörper wurde nach Vortestung mit einer Verdünnung von 1/30 eingesetzt (Anti-Kaninchen-IgG von der Ziege). Abb. 23 zeigt eine

typische Standard-Inhibitionskurve des OCAA-3-Radioimmunoassays unter Verwendung des Antiserums Nr. 17. Die Prozent-Aktivitätswerte der geometrischen Standard-Verdünnungsreihe ergeben - nach dem Logit-Log-Verfahren aufgezeichnet - eine Gerade, deren Regressionsgleichung (ermittelt nach dem Prinzip der kleinsten Abweichungsquadrate) die folgende Form hat:

$$y \text{ (logit)} = 3,678 - 2,482 \times (\log \text{ Konz.})$$

(N = 8; r = - 0,998)

nach der allgemeinen Geraden-Gleichung $y = A - B \times$ stellt A den Wert des y-Achsenabschnitts dar und B die Steigung der Geraden.

Nach ausführlichen Vorversuchen wurde für die OCAA-3-Bestimmung im Serum das folgende in Tab. 12 wiedergegebene Pipettierschema festgelegt.

7.2.5.4.4 OCAA-4

Ein Antiserum gegen normalen Colonschleimhaut-Perchlorsäure-Extrakt (A-NE, Max), das in Übereinstimmung mit dem Antiserum Nr. 3 (Gundula) OCAA-3 in OEP I und OEP IV entdeckt hatte, zeigte gegen OEP IV noch eine deutliche Präzipitationslinie gegen ein niedermolekulares Protein, das sich deshalb durch Gelfiltration mittels Sepharose 6 B in Fr. 6 B/IV und ferner durch Affinitätschromatographie an CNBr-aktiv. Sepharose 4 B mit angekoppeltem Anti-NE-IgG weiter reinigen ließ (Abb. 16, 24). Dieses auch in normalem Lungenextrakt nachweisbare Antigen, dessen fehlende Übereinstimmung mit NCA durch ein Referenz-Anti-

NCA-Serum ausgeschlossen werden konnte, ließ sich mittels High Performance Liquid Chromatography an einer LKB-UltroPak TAK G 4 000 SW-Säule (7,5 x 600 mm) weiter reinigen und als eine molekulargewichtsmäßig einheitliche Fraktion mit einem Molekulargewicht von 4×10^4 Daltons ausweisen (Abb. 25). Immunologisch hatte OCAA-4 keine Beziehung zu CEA, NCA, alpha-Chymotrypsin sowie andere Serumproteine. Gegen dieses gereinigte Antigen wurde ein Kaninchen-Hyperimmunserum (Nr. 34) hergestellt, ferner zeigten zwei weitere Antiseren gegen OEP III (Nr. 15) und eine Unterfraktion von OEP III (Nr. 35) eine positive Reaktion. Gegen OEP III Gesamtextrakt zeigte Anti-NE-Serum und Nr. 34 eine einzige Präzipitationslinie mit immunologischer Identitätsreaktion, während Nr. 35 - alle nach Absorption mit NS und AB-Erythrozyten - noch eine angedeutete zweite Präzipitationslinie gegen OEP III aufwies. (Abb. 26). OCAA-4 und die Antiseren Nr. 34 und 35 wurden zur Herstellung eines Radioimmunoassays verwandt. Abb. 27 gibt die Gelfiltration des mit Jod¹²⁵ markierten Tracers zur Trennung von freiem Jod (Sephadex G 50) bzw. weitere Auftrennung des Tracers (Sephadex G 100) wieder. Nur 3,4% der Radioaktivität wurden in das Protein eingebaut. Davon konnten nach Auftrennung auf der Sephadex G 100-Säule 64% als einheitliche Hauptfraktion als Tracer mit einer spezifischen Aktivität von 5,0 µCi/µg verwandt werden. Abb. 28 zeigt typische Antikörper-Verdünnungskurven mit den Antiseren Nr. 34 und 35 (nach zusätzlicher Antikörper-Präparation des spezifischen Antikörpers über eine CNBr-aktiv. Sepharose 4 B-Säule mit angekoppeltem Lungenextrakt) unter Verwendung des OCAA-4-Tracers mit nahezu

übereinstimmenden parallelen Kurven. In Abb. 29 ist eine typische Standard-Inhibitionskurve für den OCAA-4-Radioimmunoassay unter Logit-Log-Auswertung wiedergegeben; wegen einer leichten Knickung der Kurve geben zwei Regressionsgeraden mit einem Grenzwert bei 50% die Auswertung besser wieder. Die verwandte 1. Antikörper-Verdünnung (Nr. 34) betrug 1/500, die dabei erhaltenen Bindungsaktivität des 0-Wertes 36,9%.

7.2.6 Klinische Untersuchung - Serumbestimmungen

Eine Zusammenstellung relevanter in den Patientenserum gemessener Parameter sowie Angaben zu Alter, Tumorstadium und Metastasenstatus finden sich in Tab. 7. Die Serumbefunde der prätherapeutischen Spiegel von AFP, CEA und Ferritin sind in Abbildung 30 vergleichend gegenübergestellt, ihre wichtigsten statistischen Kenngrößen finden sich in den Tabellen 14, 15, 16.

7.2.6.1 Normalkollektive

Für Alpha-Fetoprotein wurden in einem Kollektiv von 140 Normalpersonen im Alter von 25 bis 85 Jahren in 86,4% der Fälle Serumspiegel unter 5 ng/ml, bei den restlichen 19 Personen Werte zwischen 5 und 14 ng/ml gefunden. Aufgrund dieser Befunde wurde der AFP-Normalbereich bis 15 ng/ml festgelegt.

Bei 60 Probanden im Alter zwischen 20 und 45 Jahren ergab sich ein mittlerer CEA-Spiegel von $1,4 \pm 0,7$ ng/ml mit sämtlichen Werten unter 3 ng/ml. Der CEA-Normbereich wurde deshalb bis

3 ng/ml festgelegt.

In einem Normalkollektiv von 94 Probanden im Alter zwischen 20 und 52 Jahren (45 weibl./49 männl.) wurde eine mittlere Ferritin-Serumkonzentration von $127,7 \pm 48,2$ ng/ml (Var.-Koeff.= 37,8%) gefunden. Dem entsprach ein Median von 123,9 ng/ml und ein mittlerer 90%-Bereich zwischen 53,6 (5. Perzentil) und 220,6 (95. Perzentil). Der Normbereich wurde deshalb bis 250 ng/ml festgelegt.

Mit dem OCAA-3-Radioimmunoassay (Empfindlichkeit 3 E/ml; 1 E = 1 ng; intra-Assay-Variation bei 9,3%) wurden in einem Normalkollektiv von 69 männlichen Jugendlichen im Alter von 18 bis 35 Jahren normalverteilte OCAA-3-Serumspiegel mit einem Mittelwert von $10,9 \pm 2,6$ E/ml ($\bar{x} \pm s$) mit einem mittleren 90%-Bereich zwischen 6,9 E/ml (5. Perz.) und 16,3 E/ml (95. Perz.) gefunden. Die Normgrenze wurde deshalb auf 16 E/ml festgelegt. Mit dem OCAA-4-Radioimmunoassay (Empfindlichkeit 2,5 E/ml; 1 E = 1 ng) wurde in einem Normalkollektiv von 10 gesunden Probanden ein Mittelwert von $40,0 \pm 4,9$ E/ml (Var.Koeff. 12,2%) gefunden. Der Normgrenzwert wurde bei 50 E/ml festgelegt.

7.2.6.2 Patientinnen mit Ovarialkarzinom

Altersverteilung (Tab. 13)

Das Gesamtkollektiv von 164 Patientinnen mit Ovarialkarzinom zeigte einen Altersmedian von 59,1 Jahren mit einem zentralen 80%-Bereich zwischen 44,1 (10. Perzentil) und 72,1 Jahren (90. Perzentil). Die Altersverteilung entsprach annähernd einer

Normalverteilung. Zwischen den Altersverteilungen der einzelnen klinischen Stadiengruppen I - IV bestand kein signifikanter Unterschied.

7.2.6.2.1 OCAA-1-Ferritin (Abb. 30, Tab. 16)

Von den untersuchten 162 Fällen lagen deutlich wesentlich mehr Ferritinspiegel im pathologischen Bereich über 250 ng/ml als bei den Tumormarkern. Der Anteil pathologischer anderen Ferritin-Werte stieg von Gruppe I nach IV von 34% über 56% und 64,7% nach 82,1% an. Ebenso stiegen die Medianwerte von Gruppe I nach IV von 201,7 ng/ml bis maximal 456,7 ng/ml an. Ferner waren die zentralen 80%-Bereiche deutlich nach oben verschoben mit einem ansteigenden 10-Perzentil von 51,0 bis 139,6 ng/ml bzw. einem 90. Perzentil von 452,1 bis maximal 1690,7 ng/ml (Gruppe IV). Ein statistischer Vergleich der Ferritin-Verteilungen der einzelnen Stadiengruppen untereinander ergab eine signifikante Differenz mit ansteigendem Signifikanz-Niveau von Gruppe I nach II, III und IV ($p < 0,001$), während sonst nur noch Gruppe II gegen Gruppe IV signifikant unterschieden war ($p < 0,05$), nicht jedoch gegen Gruppe III; ebenfalls bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Gruppe III und IV.

7.2.6.2.1.1 Ferritin-Verlaufsbestimmungen

In Abb. 32 sind die Ferritin-Werte einer kleinen Patientenzahl mit Verlaufsbestimmungen im Vergleich zu einer Gruppe mit histologischen sogenannten borderline-Veränderungen aufgetragen. Wie aus dem Vergleich hervorgeht, lagen die präoperativen Ferri-

tinspiegel der borderline-Fälle überwiegend im Normbereich bzw. in 2 Fällen im niedrig-pathologischen Bereich, während von den Ovarialkarzinom-Fällen präoperativ sämtliche inoperablen Fälle von Stadium III/IV und Fälle von Stadium III mit disseminierter Erkrankung sämtlich im pathologischen Bereich lagen. Von den Fällen im Stadium I/II mit lokal begrenzter Erkrankung lag etwa die Hälfte im Normbereich. Bei einigen wenigen Verlaufskontrollen im Zeitraum von 2 - 6 Monaten nach Operation zeigten 2 Fälle ohne Anhalt für ein Rezidiv einen abfallenden Ferritinspiegel, davon einmal in den Normbereich, wohingegen 3 Fälle mit progredienter Erkrankung zweimal einen weiteren Anstieg im pathologischen Bereich und einmal einen Abfall innerhalb des pathologischen Bereiches aufwiesen.

7.2.6.2.2 OCAA₂- Carcinoembryonales Antigen (Abb. 30, Tab. 15)

Der unter CEA 7.2.5.4.2 beschriebene CEA-OV-Radioimmunoassay, der mit Hilfe von CEA-Antigen- und-Antikörper-Präparationen bzw. gegen Ovarialkarzinomgewebs-Extrakt hergestellt wurde, zeigte bei Untersuchung von Seren verschiedener Tumorpatientengruppen im Vergleich zu einem seit Jahren etablierten CEA-CO-Radioimmunoassay keine signifikanten Meßwertunterschiede(39,115). Wie aus Abb. 31 hervorgeht, wurden für die insgesamt 91 Serumproben der Vergleichskollektive über einen Meßbereich von ≤ 2 bis über 80 ng/ml gut vergleichbare Meßwerte gemessen. Nach der aus den einzelnen Wertepaaren ermittelten Regression zeigte sich ein linearer Korrelationskoeffizient von $r = 0,773$ ($p < 0,001$) und ein Rangkorrelationskoeffizient von $r_s = 0,992$

($p < 0,001$). Wegen dieser guten Übereinstimmung der beiden Radioimmunassays wurden zur Auswertung der CEA-Befunde des Gesamtkollektivs der Patientinnen mit Ovarialkarzinom nur die mit dem CEA-CO-Radioimmunoassay ermittelten CEA-Spiegel herangezogen.

Wie aus Abb. 30 ersichtlich, lagen 9,3% der CEA-Spiegel von Gruppe I, 26,9% der Werte von Gruppe II, 11,8% der Spiegel von Gruppe III und 29,9% der Werte von Gruppe IV über der Normgrenze von 3 ng/ml (maximaler CEA-Wert von 594 ng/ml). Die Verteilung der CEA-Werte der einzelnen Gruppen war deutlicher linkssteil und wies Medianwerte von Gruppe I - IV von 1,7, 2,0, 1,7 und 2,1 mit zentralen 80%-Bereichen zwischen 0,3/0,4 (10 Perz.) und 3,0 - 5,6 (90 Perz.) ng/ml auf. Zwischen den CEA-Spiegelverteilungen der einzelnen klinischen Stadiengruppen bestand kein signifikanter Unterschied, wenn auch Gruppe IV nahezu ein Drittel erhöhter CEA-Spiegel aufwies.

7.2.6.2.3 Alpha-Fetoprotein (Abb. 30, Tab. 14)

Wie aus Abb. 30 ersichtlich, lagen insgesamt nur 8 AFP-Werte der vier klinischen Stadiengruppen oberhalb der Normgrenze von 15 ng/ml (bis maximal 145 ug/ml). Die AFP-Spiegelverteilung der einzelnen Gruppen war leicht linkssteil mit Medianwerten zwischen 3,7 ng/ml und 4,8 ng/ml sowie den zentralen 80%-Bereichen zwischen 0,8 - 1,9 ng/ml (10 Perzentil) und 8,7 - 11,0 ng/ml (90 Perzentil). Zwischen den AFP-Spiegelverteilungen

der vier klinischen Stadiengruppen bestand kein statistisch signifikanter Unterschied.

7.2.6.2.4 OCAA₃

Die vorläufige Untersuchung von 296 Seren von Patientinnen mit Ovarialkarzinom verschiedener Stadien ergab eine nicht normal verteilte linkssteile Verteilung mit einem Mittelwert von 7,2 E/ml und einen zentralen 90%-Bereich zwischen 0,5 (5.Perz.) und 20,7 E/ml (95.Perz.). Nur 11% der Werte lagen über der Normgrenze bis 42 E/ml. In dieser Gruppe überwogen Patientinnen mit Stadium IV.

7.2.6.2.5 OCAA₄

Nach den vorläufigen Befunden aus einem Kollektiv von 57 Patientinnen mit Ovarialkarzinom verschiedener klinischer Stadien wurden ähnliche OCAA-4-Spiegel wie im Normalkollektiv erhoben mit einem Mittelwert von $40,9 \pm 13,2$ E/ml (Var.Koeff. 32,2%). Davon lagen nur 11% der Werte über 50 E/ml.

7.2.6.2.6 Weitere Serumparameter (Tab. 13)

7.2.6.2.6.1 BKS (1. Stunde)

In 164 Fällen konnten BKS-Befunde erhoben werden. Wie aus Tab. 13 ersichtlich, stieg in den klinischen Stadiengruppen von I nach IV der Median des 1. Stunden-BKS-Wertes von 12,1

über 27 nach 35 bzw. 30 an. Eine statistische Prüfung der BKS-Verteilung der verschiedenen Stadiengruppen ergab einen signifikanten Unterschied zwischen Gruppe I und II ($p < 0,005$) sowie von Gruppe I zu Gruppe IV ($p < 0,001$). Zwischen den anderen Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied.

7.2.6.2.6.2 Hämoglobin

Wie aus Tab. 13 zu ersehen, zeigten die normalverteilten Hb-Werte, von 13,8 über 12,7 und 12,6 nach 12,0. Zwischen den Hb-Verteilungen der einzelnen Stadiengruppen bestand jedoch kein statistisch zu sichernder Unterschied.

7.2.6.2.6.3 Hb_E:

Mit noch kleineren Variationskoeffizienten zwischen 7,1 und 13,6% zeigten die Hb_E-Werte der einzelnen Gruppen nahezu identische Mittelwerte von 30,1 bis 31,7 und keinen signifikanten Unterschied ihrer Verteilungen untereinander.

7.2.6.2.6.4 Erythrozytenzahl:

Hier lagen bei relativ kleinen Variationskoeffizienten zwischen 10,6 und 16,1% die Mittelwerte der einzelnen Stadiengruppen II bis IV übereinstimmend bei 4,0/4,1 Mio, wohingegen in Gruppe I mit 4,5 Mio noch ein deutlich höherer Wert erreicht wurde. Bei der statistischen Prüfung der Verteilungen untereinander ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen Gruppe I und II ($p < 0,001$) sowie zur Gruppe III ($p < 0,003$) und am deutlichsten

zu Gruppe IV ($p < 0,001$). Erwartungsgemäß bestand kein Unterschied zwischen den Gruppen II und IV.

7.2.6.2.6.5 Multivariate Prüfungen

Als dichotomisierte Verteilungen wurden in die Prüfung einbezogen das klinische Stadium (I + II gegen III + IV), die BKS ($\leq / > 20$), das Hämoglobin ($\leq / > 13$), die Erythrozytenzahl ($\leq / > 4$ Mio), der CEA-Wert ($\leq / > 3$ ng/ml) und Ferritin-Spiegel ($\leq / > 250$ ng/ml). Wie aus Abb. 33 ersichtlich, wurden zwischen den einzelnen Parametern meist signifikante Beziehungen gefunden bis auf CEA, das zu keinem Parameter eine signifikante Beziehung aufwies. Eine besonders deutliche Beziehung bestand zwischen dem Stadium und der BKS ($p < 0,001$), Hb und Erythrozytenzahl ($p < 0,001$ bis $p < 0,03$) und dem Ferritinspiegel ($p < 0,001$). Auch zwischen BKS, Hb und Erythrozytenzahl und dem Ferritinspiegel bestand eine bedeutsame Beziehung, ferner zwischen Hb und Erythrozytenzahl und der Erythrozytenzahl und dem Ferritin.

Aufgrund dieser gefundenen Korrelationen wurden noch die linearen Regressionen und Korrelationskoeffizienten zwischen Ferritin, Hb, Erythrozytenzahl und der BKS berechnet (Tab. 17).

Danach bestand eine signifikante positive lineare Korrelation zwischen Hb und Erythrozytenzahl ($r = 0,761$, $p < 0,001$) sowie zwischen dem Ferritinspiegel und der BKS ($r = 0,450$, $p < 0,001$).

Eine umgekehrte negative Korrelation fand sich zwischen Ferritin und Hb ($r = -0,431$, $p < 0,001$) sowie zur Erythrozytenzahl ($r = -0,438$, $p < 0,001$), ferner zwischen BKS und Hb ($r = -0,578$, $p < 0,001$) und zwischen BKS und Erythrozytenzahl ($r = -0,480$, $p < 0,001$). Aus diesen Korrelationsberechnungen folgt, daß eine signifikante Korrelation zwischen steigenden Hb- und Erythrozytenwerten sowie zwischen steigenden Ferritin- und BKS-Werten bestand, ferner zwischen steigenden Ferritin- und sinkenden Hb/Erythrozytenwerten sowie zwischen steigender BKS und sinkenden Hb- bzw. Erythrozytenwerten.

8. DISKUSSION

8.1 OCAA-1 (Ferritin)

Mit den Antiseren Nr. 2 (OES 1 gesamt), 5 (OES G200 I) und 9 (OES G 200 I) konnte in der Immundiffusion gegen den salinen Tumorextrakt OES eine übereinstimmende Präzipitationslinie nachgewiesen werden, die eine immunologische Identitätsreaktion bzw. partielle Identitätsreaktion (Nr. 9) mit einem Referenzantiferritinserum zeigte. Daraus folgt, daß Antiserum Nr. 9 mindestens eine zusätzliche Antigendeterminante eines ferritinähnlichen Antigens in OES erkannte. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung von OES war OCAA-1 (Ferritin) nur in der Fraktion G 200 I entsprechend einem Molekulargewicht von 10^5 bis 10^6 nachweisbar, nicht aber in anderen G 200-Fraktionen von OES 6 B I oder in OEP. Da normalserumabsorbiertes Anti-OCAA-1-Serum noch mit normalem salinen Ovarialgewebsextrakt (ONES) reagierte, wurde eine entsprechende zusätzliche Absorption mit ONES durchgeführt. Wie aus Abbildung 5 c hervorgeht, war danach mit Antiserum Nr. 5 (OES G 200 I) die Präzipitationslinie gegen ONES stark abgeschwächt bis aufgehoben, während sie gegen OES bzw. OES G 200 I unverändert bestehen blieb. Aufgrund seines Trennungsverhaltens in der Gelfiltration weist OCAA-1 ein Molekulargewicht im Bereich zwischen 10^5 und 10^6 Daltons auf.

Ferritin ist neben dem Hämosiderin, einem Ferritinabbauprodukt, das wichtigste ubiquitäre Eisenspeicherprotein des Körpers vieler Spezies, das eine zentrale Rolle im Eisenmetabolismus eukaryotischer Zellen spielt (128).

Ferritin besteht aus einer 30 Å dicken sphärischen Proteinhülle (Apo ferritin) in Form eines pentagonalen Dodekahedrons (Molekulargewicht um 450 000) mit einem Durchmesser von 130 Angström und einem Eisenkern mit bis zu 5 000 Eisenatomen aus Kristallen von Ferrooxyhydroxyphosphat. Die Proteinschale besteht aus 24 Untereinheiten von einem Molekulargewicht zwischen 18 000 und 21 000 Daltons.

Mit Hilfe der Chromatographie, der Elektrophorese und immunologischer Verfahren konnte die Heterogenität verschiedener Ferritine (Isoferritine) bewiesen und auf die Primärstruktur (ungefähr 20 unterschiedliche humane Isoferritine mit einem p I von 4,8 bis 5,8) zurückgeführt werden. Es werden zwei Subtypen der Leichtketten mit leicht unterschiedlichem p I und Molekulargewicht postuliert (61): Die H-Subeinheit (Molekulargewicht 21 000) scheint in mehr sauren Isoferritinen (Niere, Herz, Pankreas, frühe Placenta- und HeLa-Zellen) und der L-Subtyp (Molekulargewicht 19 000) in mehr basischen Isoferritinen (Leber, Milz) zu dominieren. Die Entstehung aller verschiedenen Isoferritine mit unterschiedlichen p I-Werten erklärt man sich durch eine unterschiedliche Mischung dieser beiden Leichtkettenuntereinheiten. Der basischste Typ soll ein Homopolymer der L-Untereinheit und der sauerste Typ ein Homopolymer der H-Untereinheit darstellen.

Aufgrund ihrer physiko-chemischen Unterschiede postulierte man auch immunologische Unterschiede von Isoferritinen. Durch eine intensive Kreuzreaktivität zwischen den Isoferritinen und zwar sowohl zwischen den Isoferritinen verschiedener Organe

einer Spezies als auch zwischen den Isoferritinen verschiedener Spezies konnte dieser Nachweis nur sehr schwer mit polyklonalen Antikörpern geführt werden (61).

Bei der Untersuchung von Seren von Kaninchen, die mit Isoferritinmischungen immunisiert wurden, schienen überwiegend Antikörper gegen basische Isoferritine gebildet zu werden. Demgegenüber fanden sich überwiegend Antikörper gegen saure Isoferritine bei der Immunisierung von Meerschweinchen oder Schafen. Durch Immunisierung von Meerschweinchen mit HeLa-Zellferritin konnte ein Antiserum gewonnen werden, das nach Absorption mit basischem Isoferritin (Leber) nur noch mit HeLa-Zellferritin und saurem Herz-Isoferritin reagierte (81).

Bei Verwendung solcher Antiseren in einem Ferritin-Radioimmunoassay zur Serumferritinbestimmung zeigten sich mit den beiden unterschiedlichen Antiseren unterschiedliche Inhibitionskurven, die auf eine unterschiedliche Erfassung der heterogenen Serumferritine schließen lassen.

Wie aus Abbildung 2 a und 2 b hervorgeht, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Extraktpräparation und chromatographische Reinigung von OCAA-1 aus salinem Tumorextrakt gewählt, die nicht den konventionellen unterschiedlichen Methoden, wie sie zur Ferritinpräparation beschrieben wurden, entspricht. Die in dieser Arbeit beschriebene saline Extraktionsmethode stellt das schonendste Verfahren zur Tumorextraktverarbeitung bei der Suche nach unbekannten tumorassoziierten Antigenen dar. Die Hitzefällung (70 bis 80⁰, 10 Minuten) wird von den meisten

Autoren zur Ferritingewinnung aus verschiedenen Geweben bevorzugt, da sie zum Verlust des größten Teils von verunreinigenden Proteinen bei nahezu vollständiger Bewahrung der Ferritine führt. Nach der Hitzefällung und Zentrifugation wird lediglich der Überstand weiterverwandt(128). Ferritin kann in diesem Überstand entweder durch Ammoniumsulfat gefällt und nach Wiederauflösung durch Calciumsulfat im Präzipitat als kristallines Ferritin bzw. im Überstand als nichtkristallines Ferritin erhalten werden (78). Ferner kann es durch ein Zentrifugationsverfahren (78 000 g, eine Stunde, Ferritin im Präzipitat, Wiederauflösung und Nachzentrifugation bei 95 000 g, eine Stunde); (140) oder aber nach pH-Einstellung auf 4,8 im Überstand über CM-Zellulose weiter gereinigt, dann durch 50%iges Ammoniumsulfat gefällt und nach Wiederauflösung weiter über Sephadex G 200 oder auch Sepharose 4 b und abschließender Zentrifugation (bei 1000 g, 4 Stunden) erhalten werden (128). Schließlich läßt es sich auch mit Hilfe eines Antikörpers wie bei uns gewinnen (61). Da aber, wie inzwischen beschrieben (69), schon die Hitzefällung zu einem Verlust von überwiegend sauren Isoferritinen führen soll und auch die Fällung von Ferritin mit Hilfe einer 50%igen Ammoniumsulfat-Lösung bei weitem nicht vollständig ist, stellt bei der Suche nach einem möglichen immunologischen Unterschied von Tumorisoferritin und Normalgewebisoferritin die von uns verwendete Ferritinpräparation im salinen Verfahren die schonendste Methode zu einer breiten und möglichst vollständigen Isoferritingewinnung dar.

Für die empfindliche Messung von Ferritin vor allem in Serumproben, sind praktisch nur radio- oder enzymimmunologische Verfahren brauchbar. Unter den radioimmunologischen Verfahren, die meist mit dem Isotop J-125 durchgeführt werden, unterscheidet man den Radioimmunoassay, bei dem das Antigen markiert wird oder den immunoradiometrischen Assay, bei dem der oder einer der Antikörper (2-site-IRMA) markiert wird. In dieser Arbeit wurde ein kommerziell erhältlicher Ferritin-IRMA (Riagnost, Behring-Werke) verwendet.

Serum-Untersuchungen

Der Serum-Ferritinspiegel weist eine enge Korrelation mit dem Eisengehalt im Knochenmark auf (128). Bei Normalpersonen konnte nach einer größeren Literaturzusammenstellung (Tab.5) (114) bei Männern ein normaler Serum-Ferritin-Mittelwert um 144 ng/ml und bei Frauen von 60 ng/ml gefunden werden, wobei die obere Normwertgrenze nach den meisten Publikationen etwa bei 200 bis 250 ng/ml angegeben wurde. Wegen der relativ guten Korrelation des Serum-Ferritin-Spiegels mit dem Eisengehalt des Knochenmarks ließ sich ein Abfall des Serumspiegels bei Patienten mit Eisenmangel (Eisenmangelanämie) und eine signifikante Serum-Spiegelerhöhung bei Eisenüberladung (Hämochromatose, Hämasiderose) bzw. unter Eisentherapie bei aplastischer und hämolytischer Anämie und bei Thalassemie nachweisen. Zusätzlich wurden erhöhte Ferritinspiegel bei benignen Erkrankungen wie Lebererkrankungen (Hepatitis, Leberzirrhose), bei Infektionen und beim Herzinfarkt beobachtet.

In Tabelle 5 sind die Serum-Ferritinspiegel von Patienten mit verschiedenen Tumorerkrankungen aufgeführt. Ein erhöhter Serum-Ferritinspiegel bei Tumorpatienten kann auf eine vermehrte Eisenspeicherung im RES, im Zusammenhang mit einer verschlechterten Erythropoese, durch Entzündungserscheinungen und Tumornekrose, ferner durch Tumormetastasen in der Leber oder auch durch eine vermehrte Synthese von Ferritin durch Tumorzellen erklärt werden. Diese letzte Möglichkeit konnte vor allem für Leukämien und Morbus Hodgkin bewiesen werden (114).

Von den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patientinnen mit Ovarialkarzinom (n = 161) waren deutliche pathologische Ferritinwerte in Abhängigkeit vom Stadium der Erkrankung zu messen. So lagen 34% im Stadium, -I, 56% im Stadium II, 64,7% im Stadium III und 82,1% im Stadium IV im pathologischen Bereich. Ebenso stiegen die Medianwerte von Gruppe I nach IV von 201, 7 ng/ml bis max. 456,7 ng/ml an. Ferner waren die zentralen 80% Bereiche deutlich nach oben verschoben mit einem ansteigenden 10. Perzentil von 51,0 bis 139,6 ng/ml bzw. mit einem 90. Perzentil von 452,1 bis max 1690,7 ng/ml (Gruppe IV).

Ein statistischer Vergleich der Ferritinverteilungen der einzelnen Stadiumgruppen untereinander ergab eine signifikante Differenz mit ansteigendem Signifikanzniveau von Gruppe I nach II, III und IV ($p < 0,001$), während sonst nur noch Gruppe II gegen Gruppe IV signifikant unterschieden war ($p < 0,05$), nicht jedoch gegen Gruppe III; ebenfalls bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Gruppe III und IV.

Bei den wenigen Verlaufsbestimmungen im Vergleich zu einer Gruppe mit sogenannten histologischen Borderlineveränderungen lagen die präoperativen Ferritinspiegel der Borderlinefälle überwiegend im Normbereich bzw. in zwei Fällen im niedrig-pathologischen Bereich, während von den Ovarialkarzinomfällen präoperativ sämtliche inoperablen Fälle von Stadium III und IV und Fälle von Stadium III mit disseminierter Erkrankung sämtlich im pathologischen Bereich lagen. Von den Fällen im Stadium I/II mit lokal begrenzter Erkrankung lag etwa die Hälfte im Normbereich. Von einigen wenigen Verlaufskontrollen im Zeitraum von 2 bis 6 Monaten nach Operation zeigten zwei Fälle ohne Anhalt für ein Rezidiv einen abfallenden Ferritinspiegel, davon einmal in den Normbereich, wohingegen drei Fälle mit progredienter Erkrankung zweimal einen weiteren Anstieg im pathologischen Bereich und einmal einen Abfall innerhalb des pathologischen Bereichs aufwiesen.

LAHOUSEN et al. 1984 (110) führten Serumferritin-Verlaufsbestimmungen bei Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom der Stadien III und IV unter postoperativer Chemotherapie durch. Wegen der stark differierenden Normwerte wurde aus statistischen Gründen eine neue Kenngröße, nämlich der mittlere Ferritinspiegel eingeführt. Entsprechend unseren eigenen Ergebnissen fanden die Autoren eine Korrelation zwischen erhöhten oder ansteigenden Serum-Ferritinspiegeln mit Progredienz bzw. Rezidiv der Tumorerkrankung. Sie fanden bei 41 Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom (Stadium III/IV) und mit mittleren Ferritin-Serum-Spiegelwerten über 700 ng/ml in 68,4% Karzinomrezidive;

bei Fällen mit Werten unter 700 ng/ml dagegen nur in 31,8%. Gemessen wurden die Serum-Ferritin-Spiegel wie bei uns mit der Doppelantikörper-IRMA-Methode "Riagnost" (Fa. Behring-Werke) (Normalwert 0 - 300 ng/ml).

Wie auch bei anderen Tumormarkern, scheint dem Serum-Ferritin-Test im Verlauf beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom eine gewisse prognostische Bedeutung zuzukommen. Dabei spricht ein Anstieg des Ferritinspiegels für eine Progredienz bzw. ein Tumorrezidiv, während ein kurzfristiger Ferritin-Spiegelabfall mit einer Remission korreliert.

8.2 OCAA-2-CEA

CEA wurde erstmals von GOLD und FREEDMANN 1965 als ein tumor- und organspezifisches Antigen des Gastrointestinaltraktes beschrieben (72). Die meisten CEA-Präparationen wurden durch Perchlorsäure-Extraktion gewonnen. Durch die Entwicklung empfindlicherer Meßmethoden gelang in den folgenden Jahren auch der Nachweis in anderen Tumoren (z.B. Mamma-Ca., Pankreas-Ca., Bronchial-Ca.), in deutlich niedrigerer Konzentration in entzündlich veränderten Geweben (Leber, Pankreas) und noch niedriger in Normalorganen (Darm, Lunge u.a.).

Der erste Nachweis von CEA bei Ovarialtumoren stammt von PLETSCHE et al. (141) im Jahre 1974.

KNAUF et al. (102) wiesen bei der Suche nach tumorassoziierten Antigenen beim Ovarialkarzinom auch CEA in Perchlorsäureextrakten und seinen chromatographierten Fraktionen nach.

DEBOER et al. (54) konnten mit Hilfe der Immunfluoreszenz-technik CEA in einer muzinösen Ovarialcyste in einem borderline Tumor eines anaplastischen epithelialen Tumors nachweisen.

TATARINOV et al. (171) fand in 3 von 17 Adenokarzinomextrakten und in 7 von 8 pseudomuzinösen Kystomen CEA.

Mit Hilfe der Immunperoxidase-Färbung untersuchten HEALD et al. (82) 82 epitheliale Ovarialtumoren unterschiedlicher Histologie und fanden keine signifikanten Unterschiede in der CEA-Inzidenz. Bei dieser Untersuchung wurden Paraffinfixierte Tumorschnitte mit Anti-CEA-Serum verschiedener Verdünnungen von 1:100 bis 1:4000 behandelt. Dabei ließ sich bei muzinösen Tumoren CEA noch mit stärkerer Verdünnung nachweisen. Es fand sich keine Korrelation von Malignitätsgrad zur CEA-Konzentration im Gewebe, da auch eine hohe Anzahl benigner Ovarialtumoren erhöhte CEA-Gewebespiegel aufwiesen.

Unsere Untersuchungen beschränken sich auf Perchlorsäure-tumorextrakte, da bekannterweise CEA perchlorsäure-stabil ist, aber durch die Perchlorsäure die meisten Serumproteine, die bei weiteren Untersuchungen störend wirken, denaturiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine leicht modifizierte Extraktionsmethode nach KRUPPEY et al. (109) verwandt. Mittels Gelfiltration an Sephadex G 200 wurde das extrahierte CEA angereichert und mit Hilfe einer Immunadsorptionssäule (CNBr-aktivierten Sepharose 4 B mit angekoppeltem Anti-CEA-IgG vom

Kaninchen) isoliert.

Das hochgereinigte Ovarialkarzinom-CEA (CEA-OV) diente als Ausgangsmaterial zur Immunisierung und Herstellung eines monospezifischen Antiserums sowie als Ausgangsmaterial zum Aufbau eines CEA-RIA als Doppelantikörpertest. Beim Vergleich im Immunodiffusionstest mit anderen Referenz-Organ-CEA-Präparationen aus Mamma-, Pankreas-, Colon- und Bronchial-Karzinomen und unter Verwendung verschiedener Anti-Organ-CEA-Antiseren zeigte sich eine immunologische Identitätsreaktion zwischen den verschiedenen CEA-Präparationen und Antiseren mit gegenseitig möglicher vollständiger Absorption (7.2.5.4.2).

Beim Vergleich der Antikörperbindungskurven gegen Referenz-Colon-CEA- und CEA-OV-Tracer zeigten sowohl das Anti-CEA-CO-Antiserum als auch das Anti-CEA-OV-Antiserum gegen CEA-CO-Tracer ein gut vergleichbares Bindungsverhalten, ferner auch gegenüber den CEA-OV-Tracer. Beim Austausch der verschiedenen Tracer, organunterschiedlichen Standards und Antiseren ergab sich der geringste Unterschied beim Austausch verschiedener Standards (CEA-CO, CEA-OV), ein etwas größerer Unterschied für die Antiseren und der größte Unterschied für die Tracer. Die größeren Differenzen bei Verwendung zweier Tracer erklären sich aus den schädigenden Einflüssen bei der Radiojod-Markierung durch Radioaktivität als auch durch den Einfluß des Oxidationsmittels (Chloramin T).

Bei der nachfolgenden Testung des Referenz-CEA-CO- und CEA-OV-RIA-Systems gegenüber verschiedenen Kollektiven unterschiedlicher Tumorphatientengruppen (Mamma-, Gastro-intestinale-, Pankreas-, Bronchial-Ca., Ca. unbekannten Ursprungs), zeigten die erhaltenen jeweiligen CEA-Befunde keine signifikanten Unterschiede: bei 164 Fällen wurde ein Spearman'scher Korrelationskoeffizient von $r_s = 0,969$ ($p < 0,001$) gefunden. Dieser Befund spricht dafür, daß bei Verwendung von monospezifischen polyklonalen Anti-CEA-Seren unabhängig von den verwendeten CEA-RIA-Systemen keine signifikant unterschiedlichen Befunde bezüglich der CEA-Spiegel im Serum und anderen Körperflüssigkeiten zu erwarten sind.

Andere Untersucher haben bisher keine vergleichbare Untersuchungsanordnung verwandt. Bei dem von SANTEN et al. (151) postulierten antigenetischen Unterschieden zwischen Mammakarzinom-CEA und Colon-CEA aufgrund von differenten Messungen mittels eines Anti-Mammakarzinom-CEA-Antiserums in der Radio-Raketen-Immuno-diffusion (eindimensionale Laurell-Elektrophorese) bestehen erhebliche Zweifel an der Reinheit der in den Abbildungen dargestellten CEA-Präparationen und der Verdacht auf eine Verunreinigung durch das "nonspezifisch crossreacting antigen" (NCA), was allein die beschriebenen Unterschiede erklären könnte. Bezüglich einer Ovarialkarzinom-CEA-Präparation aus Ascites konnten HILL et al. (84) eine immunologische Identitätsreaktion zum Colon-CEA mittels eines Anti-CEA-CO-Serums in der Immunodiffusion nachweisen.

Wir konnten CEA lediglich in einem der vier Extrakte (OEP II) nachweisen. Verglichen mit den anderen Extrakten wurde in diesem vor allem ein muzinöses Adenokarzinom mitverarbeitet. Dies bestätigt die Befunde von HEALD et al. (82), die in muzinösen Karzinomen höhere CEA-Konzentrationen gemessen hatten als in serösen Tumoren.

Serum-Untersuchungen

Bei der Untersuchung von Serum/Plasma zeigen Normalpersonen einen Basisspiegel von je nach Methode 2,5 bis 12,5 ng/ml, wobei leicht höhere Werte bei Rauchern als bei Nichtrauchern gemessen wurden (111). Erhöhte CEA-Serum/Plasma-Spiegel fanden sich vorwiegend bei colorektalen Karzinomen (nach einer Sammelstatistik in 71%), Pankreas- (80%), Magen- (45%), Bronchial- (71%) und metastasierendem Mammakarzinom (54%). Erhöhte Serum/Plasma-Spiegel wurden aber auch bei benignen Erkrankungen vorwiegend des Darms (Colitis ulcerosa, M. Crohn), bei akuter/chronischer Pankreatitis, bei Hepatitis und Leberzirrhose sowie bei Lungenemphysem und Bronchitis gemessen.

Dabei zeigt sich unter Berücksichtigung von Konzentrationsbereichen, daß die pathologischen CEA-Spiegel bei benignen Erkrankungen eher im niedrigeren Bereich liegen, während deutliche CEA-Spiegel-Erhöhungen, z.B. über 10-15 ng/ml fast ausschließlich bei Tumorerkrankungen (18-46%) zu finden sind. Für die Klinik weit wichtiger sind Verlaufsbestimmungen des Serum-CEA-Spiegels. Dabei zeigt sich, daß bei benignen Erkrankungen die CEA-Spiegel, wenn überhaupt - nur intermittierend (z.B. Hepatitis) oder konstant (z.B. Leberzirrhose) im niedrig

pathologischen Bereich zu finden sind. Demgegenüber steigen bei unbehandelten Tumorerkrankungen oder Progression die CEA-Spiegel kontinuierlich und oft exponentiell an (Tab. 4).

Bei der Untersuchung von Serum-CEA-Spiegel bei Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom lagen nach der Literatur die Positivitätsraten zwischen 94% (95) und 28% (161).

In Tab. 3 a sind von verschiedenen Autoren die Positivitätsraten von Serum-CEA-Spiegeln von Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad aufgeführt. Van NAGELL et al. (132) finden dabei bei muzinösen in 53% (N = 19) und bei serösen in 31% (N = 26%) erhöhte Serum-CEA-Werte, bei gut differenzierten Tumoren in 30% (N = 18), bei schlecht differenzierten in 54% (N = 13) positive Serumwerte. Über wesentlich höhere Positivitätsraten berichteten KHOO et al. (95): Bei 93% (N = 38) der undifferenzierten und 43% (N = 35) der gut differenzierten Ovarialkarzinome waren die Serum-CEA-Spiegel erhöht. Konnte der Tumor total entfernt werden, gingen die Spiegel innerhalb von 8 Wochen zurück. DISAIA et al. (58) berichteten über in 50% erhöhte Serum-CEA-Spiegel bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom, die nach chirurgischer Intervention ebenfalls in den Normbereich abfielen.

Im Gegensatz dazu fanden SEPPÄLÄ et al. (161) eine Positivitätsrate von nur 28%. Als Grund für die hier sehr niedrige Positivitätsrate ist der Umstand zu werten, daß die Autoren als untere Normgrenze 5 ng/ml anstatt 2,5 ng/ml wählten.

Tab. 3 b zeigt die Positivitätsraten in Abhängigkeit vom Tumorstadium. Dabei fanden KHOO et al. (95) in den Stadien I und II 49% (N = 51), im Stadium III 78% (N = 37) und im Stadium IV 90% (N = 21) erhöhte Serumwerte. DISAIA et al. (58) kamen zu ähnlichen Ergebnissen: 30% der Patientinnen in den Stadien I und II (N = 23) und 60% in den Stadien III und IV (N = 88) hatten erhöhte CEA-Spiegel. VAN NAGELL et al. (132) fanden in den Stadien I und II 40% (N = 20) und in den Stadien III und IV 40% (N = 25) Serum-CEA-Spiegel-Erhöhen.

Fast identische Werte wurden in unserem eigenen Krankengut (N = 164) gemessen: in den Stadien I und II (N = 80) waren bei 36,2% und in den Stadien III und IV (N = 84) bei 41,7% erhöhte Serum-CEA-Spiegel nachweisbar.

Bei gesonderter Berücksichtigung der einzelnen Tumorstadien lagen lediglich 9,3% der CEA-Spiegel im Stadium I, 26,9% der Werte im Stadium II, 11,8% im Stadium III und 29,9% im Stadium IV über der Normgrenze von 3 ng/ml. Aufgrund dieser Befunde läßt sich feststellen, daß CEA-Bestimmungen zur Frühdiagnose und Diagnose eines Ovarialkarzinoms keinen großen Beitrag leisten können. Eine weit wichtigere Rolle spielen CEA-Verlaufsbestimmungen zur Therapiekontrolle. So bedeutet ein Wiederanstieg der Serum-CEA-Konzentration nach erfolgter Therapie fast immer ein Tumorrezidiv bzw. eine Progression.

Die in der Literatur beschriebenen großen Unterschiede der Inzidenz erhöhter CEA-Spiegel lassen sich nicht eindeutig erklären. Mögliche Ursachen könnten eine unterschiedliche

Zusammensetzung histologisch verschiedener Tumortypen als auch die Verwendung verschiedener Radioimmunoassays sein. Unsere Untersuchungen wurden mit einem im Labor entwickelten und standardisierten CEA-CO-Radioimmunodoppelantikörpertest gemessen, da, wie im Kapitel 7.2.5.4.2 beschrieben, der organ-spezifische CEA-OV-RIA keine Verbesserung bezüglich der Inzidenzraten ergab.

8.3 Alpha-Fetoprotein (AFP)

ABELEV et al. (1) beschrieben 1963 ein fetales Alpha-1-Globulin im Serum von erwachsenen Mäusen und Ratten nach partieller Hepatektomie und bei Trägern von transplantierbaren Hepatomen. Die gleichen Autoren (2) beschrieben als erste AFP bei malignen Teratomen des Hodens und des Ovars. Sie fanden bei 8 von 18 Patienten mit einem Teratokarzinom des Hodens einen erhöhten AFP-Spiegel mit Hilfe der Ouchterlony-Technik, während nur einer von 8 Patienten mit einem Seminom einen erhöhten AFP-Spiegel aufwies.

AFP ist ein Alpha-1-Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 65 000 D. Gebildet wird AFP in der fetalen Leber im Gastrointestinal-Trakt und im Dottersack. Humanes AFP wird schon ab der 4. Schwangerschaftswoche im Fetalserum nachweisbar (160). Es erreicht seine höchste Konzentration um die 13. - 15. Entwicklungswoche (1-3 mg/ml), um einige Wochen vor Geburt soweit abzufallen, dass hochempfindliche Testmethoden zum Nachweis (RIA) erforderlich sind (158).

Zum Geburtstermin zeigen die AFP-Werte im Nabelschnurblut eine große Variationsbreite (4 - 188 $\mu\text{g/ml}$) (160). Beim gesunden Erwachsenen lassen sich Serum-Konzentrationen von unter 20 ng/ml (148,159) nachweisen.

Die größte klinische Bedeutung kommt der Messung von AFP-Spiegeln bei Screeninguntersuchungen von Leberzirrhose-Kranken zu, um frühzeitig ein Leberzellkarzinom zu erkennen . TARTARINOV (169,170) fanden als erste erhöhte AFP-Spiegel bei Kranken mit Hepatomen. Durch die jetzt verfügbaren empfindlicheren Nachweismethoden stiegen die Prozentsätze der AFP-positiven Kranken mit Hepatomen bis auf über 90%, wobei ethnische Unterschiede (höhere Werte-bei Asiaten) auffielen (126).

Mit dem RIA nachweisbare Serumerhöhungen von AFP werden häufig bei Patienten mit Hepatitis und Leberzirrhose gefunden, wobei die Werte meist unter 400 mg/ml liegen. Bei noch über diesem Spiegel liegenden Werte muß an das gleichzeitige Vorliegen eines Leberzelltumors gedacht werden. Auch für diese Patientengruppe wurden die schon erwähnten ethnischen Unterschiede nachgewiesen.

Eine weitere klinisch relevante Rolle von Schwangerschaftsstörungen spielt AFP zur frühen Diagnostik (fetale Mißbildungen, fetal distress syndrom, fetaler Tod), wobei neben den Serumwerten im mütterlichen Blut auch vor allem die Fruchtwasserwerte zu berücksichtigen sind. Unter den fetalen Mißbildungen sind

es vor allem Defekte des Neuralrohres und die Anencephalie, die zu excessiven Erhöhungen der Fruchtwasser-AFP-Werte führen (36).

Eine große Bedeutung hat die Bestimmung der AFP-Spiegel bei der Diagnostik und Verlaufskontrolle von Keimzelltumoren des Hodens/Ovars und extragonadaler Lokalisation gewonnen.

Ebenso wie bei Keimzelltumoren des Hodens treten AFP-Erhöhungen bei Ovarialkarzinomen dann auf, wenn sie Dottersackanteile aufweisen. Der AFP-Spiegel fällt nach chirurgischer Behandlung von AFP-positiven Eierstockstumoren ab und kann bei den Verlaufskontrollen im Falle des Wiederaanstieges als Hinweis für ein Tumorrezidiv bzw. eine Metastasierung gewertet werden (156, 168). Auch kann sich eine enge Korrelation zwischen erhöhten AFP-Konzentrationen und dem Ausbreitungsgrad von Ovarialkarzinomen nachweisen lassen, wobei dies wiederum besonders für endodermale Sinustumoren (Dottersacktumoren) gilt (9).

DONALDSON et al. (60) konnten bei 57% ihrer 23 Patientinnen mit Ovarialkarzinom eine Erhöhung des Serum-AFP-Spiegels über 20 ng/ml nachweisen. KRALY et al. (108) untersuchten mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen RIA's Cystenflüssigkeit von 46 Ovarialtumoren (20 maligne und 26 benigne) und fanden dabei besonders hohe Werte in seröser Cystenflüssigkeit maligner Tumoren (n = 7), während sie bei benignen Teratomen niedriger waren. Ebenfalls stark erhöhte Werte waren bei muzinösen malignen cystischen Ovarialkarzinomen (n = 4) und einem endometrischen Ovarialkarzinom nachweisbar.

Daß die Bestimmung des AFP-Spiegels bei sehr heterogenen Ovarialtumoren im Einzelfall von Bedeutung sein kann, zeigen kasuistische Mitteilungen. So fanden BLUMENFELD et al. (30) bei 2 Kranken mit einem gemischten mesodermalen Tumor des Ovars stark erhöhte Serum-AFP-Spiegel, ein Befund, der vor allem für die Histogenese dieses seltenen Tumors völlig neue Aspekte eröffnet.

SEKIYA et al. (157) beschrieben bei einer 21-jährigen Frau einen Sertoli-Zelltumor des Eierstocks, der klinisch mit Virilisierungssymptomen einherging. Nach operativer Tumorentfernung fielen die Spiegel ab. Die AFP-Produktion konnte histochemisch im Neoplasma und in in vitro-Zellkulturen des Tumors nachgewiesen werden.

Daß ein primär AFP-positive Dottersackanteil enthaltender Tumor bei einem Rezidiv die Fähigkeit zur AFP-Bildung verlieren kann (durch Erscheinen undifferenzierter Zellklone) zeigt eine Mitteilung von DAMJANOV et al. (53).

Eine ähnliche Konstellation war schon von ESTERHAY et al. (65) berichtet worden.

Von den 164 untersuchten Patientinnen des eigenen Krankengutes mit Ovarialkarzinom war nur achtmal ein über der Normgrenze von 15 ng/ml erhöhter AFP-Spiegel nachweisbar, wobei hier alle klinischen Tumorstadien zusammengefasst sind. Zwei der acht Kranken hatten Lebermetastasen, während bei 6 die laborchemische Konstellation eines Leberparenchymschadens vorlag. Zwischen den Verteilungen der Alpha-Fetoprotein.-Spiegel in den

vier klinischen Tumorstadiengruppen war kein statistisch signifikanter Unterschied festzustellen. Eigene Untersuchungen zum Verlauf der AFP-Spiegel wurden nicht angestellt.

Aus den Ergebnissen der eigenen Untersuchungen folgt, daß dem AFP-Spiegel bei der Diagnostik von Ovarialkarzinomen kein Stellenwert zukommt. Allenfalls gibt die AFP-Erhöhung einen Hinweis auf das Vorliegen von Lebermetastasen oder eines Leberparenchymschadens. In diesen Fällen kommt dem AFP als Parameter zur Verlaufsbeurteilung des Tumorleidens unter verschiedenen Therapieformen eine gewisse prognostische Bedeutung zu.

8.4 OCAA-3

Mit verschiedenen Antiseren (3,5,10,15,17,30) konnte am stärksten im Perchlorsäureextrakt OEP I und dessen hochmolekularer gefiltrierter Unterfraktion sowie sehr schwach auch im salinen Ovarialkarzinomextrakt OES ein hochmolekulares Antigen ($MG > 10^6$) nachgewiesen werden, das in der Immunelektrophorese mit einer β -Mobilität wanderte und als OCAA-3 bezeichnet wurde. Dieses Antigen war auch in OEP II 6B/II und in OEP III, wenn auch in deutlich niedrigerer Konzentration nachweisbar. Zudem bestand eine deutliche Kreuzreaktion zwischen diesem Antigen und einem in normalen Colongewebsextrakten nachweisbaren niedermolekularen Antigen, wie mit Hilfe eines Antiserums gegen Colonschleimhautextrakt (Anti-NE, Max) gezeigt werden konnte. Eine Absorption des besten Anti-OCAA-3-Antiserums (Nr. 17) mit Colongewebsextrakt brachte jedoch diese Kreuzreaktion zum Verschwinden, ohne daß die Reaktion des Antiserums mit OCAA-3 wesentlich

herabgesetzt wurde. Dennoch konnte mit Hilfe dieser Kreuzreaktion OCAA-3 auf einer Immunaффinitätschromatographie-Säule (angekoppeltes Anti-NE-IgG) weiter isoliert werden. Immunodiffusionsuntersuchungen des gereinigten OCAA-3 im Ansatz gegen verschiedene Antiseren gegen bekannte Serumproteine als auch bekannte Tumorantigene konnten ausschließen, daß OCAA-3 mit AFP, CEA, NCA, FERRITIN, Lactoferrin, Lysozym, β_1 -SP1, Alpha-2-PAG, Antichymotrypsin, Fibronectin oder Fibrinogen identisch war.

Mit hochgereinigtem OCAA-3 und gereinigtem Anti-OCAA-3-IgG (17) konnte ein Radioimmunoassay etabliert werden. Mit diesem RIA (Empfindlichkeit 3 E/ml, 1E = 1 ng) konnte gegenüber einem männlichen Normalkollektiv ($\bar{x}$ = 10,9 $\pm$ 2,6 E/ml) und einer oberen Normgrenze von 16 E/ml in Seren von 196 Patientinnen mit Ovarialkarzinom eine linkssteile Verteilung mit einem Mittelwert von 7,2 E/ml und einem zentralen 90%-Bereich zwischen 0,5 und 20,7 E/ml gefunden werden. Von den 11% der Werte über der Normgrenze bis zu einem Höchstwert von 42 E/ml gehörten die meisten zu Patientinnen im Stadium IV (Fernmetastasierung) des Ovarialkarzinoms.

Die bisher vorliegenden OCAA-3-Serum-RIA-Befunde konnten erst sehr spät bei Abschluß der Dissertationsarbeit erhoben werden. Die zusätzlich geringe Anzahl von Patientinnen mit verschiedenen höheren Tumorstadien und fehlende Verlaufsbestimmungen reichen freilich nicht aus, um eine abschließende Beurteilung der Brauchbarkeit des Assays zu erlauben. Desweiteren konnte OCAA-3 bisher nicht als ein bekanntes Antigen identifiziert werden.

Im September 1979 fand in London ein von der WHO veranstalteter Workshop über den Vergleich ovarieller tumorassoziierter Antigene statt.

Das bei dieser Studie mituntersuchte OCAA-3, das in 3 verschiedenen vorgereinigten Präparationen an das Referenzlabor von N.H. Axelsen (Copenhagen, Dänemark) eingesandt worden war, reagierte in LAURELL-Immunelektrophorese-Untersuchungen (Raketen-Immunelektrophorese) nicht nur mit einigen empfindlichen Antiseren gegen unspezifische Serumproteinverunreinigungen, sondern auch in einer Fraktion mit einem monospezifischen Antiserum der Arbeitsgruppe von BHATTACHARYA (angeblich monospezifisch gegen ein als "OCAA" bezeichnetes Antigen), sowie auch mit einem Referenz-Anti-NCA-Serum. Es wurde deshalb diskutiert, ob OCAA-3 mit NCA identisch sei. Ein wesentlicher Einwand gegen diese Vermutung besteht darin, daß OCAA-3 auch unter SDS-Bedingungen ein hochmolekulares Antigen mit einem Molekulargewicht von über 10^6 Daltons darstellt, wohingegen NCA, das bekannteste mit CEA kreuzreagierende unspezifische Antigen (nonspecific crossreacting antigen = NCA = NGP) ein Molekulargewicht von ca. 60 000 Daltons und nach neueren Untersuchungen (37) auch eine höhermolekulare Form von 95 000 Daltons aufweist (146). Ein weiterer Einwand ist, daß das vom Referenzlabor verwandte Anti-NCA-Serum mit den meisten von den verschiedenen Arbeitsgruppen eingesandten Antigenproben (25/30, 83%) positiv reagierte und daß mit eigenen und Fremdantiseren gegen NCA erfolgte Untersuchungen keinerlei Reaktionen mit dem gereinigten OCAA-3 aufdeckten.

Dieser Befund wurde auch von anderer Seite bestätigt (Prof. Burtin, (pers. Mitteilung. Interessanterweise wurde OCAA-3 in der WHO-Studie auch mit Antiseren und Antigenen der Arbeitsgruppe von BARA/BURTIN in Villejuif verglichen; diese Autoren beschrieben verschiedene hochmolekulare Mukusproteine aus der Magenschleimhaut von Patienten mit Magenkarzinom und anderen gastrointestinalen Karzinomen, die auch in Ovarialkarzinomextrakten gefunden wurden und eine unterschiedliche Expression in entsprechenden Normalgeweben haben sollen (z.B. M_1 , M_4 -Antigen; 12, 13) Weder die in der WHO-Studie verwandten entsprechenden Antiseren (25, 26) noch ein ebenfalls mit M_1 und M_4 reagibler Antikörper der Bhattacharya-Arbeitsgruppe (3) gegen ein hochmolekulares Antigen in muzinöser Ovarialzystenflüssigkeit zeigten eine Reaktion mit OCAA-3, so daß dieses Antigen weiterhin als ein bisher nicht bekanntes und nicht identifiziertes Antigen aus Ovarialkarzinom-Extrakt anzusehen ist. Eine weitere Abklärung der Bedeutung dieses Antigens ist nicht nur durch RIA-Untersuchungen in Patientenseren, sondern auch durch immunhistologische Gewebsuntersuchungen in Tumorgeweben notwendig.

8.5 OCAA-4

Dieses Antigen wurde zunächst mit Hilfe eines Antiserums gegen normalen Colongewebsextrakt (Anti-NE) sowie auch mit einem Antiserum gegen einen Ovarialkarzinom-Perchlorsäure-Extrakt (Nr. 3) als ein niedermolekulares Protein vor allem in OEP-Extrakten sowie in deren niedermolekularen Gelfiltrationsfraktion (6B/IV) entdeckt und ebenfalls über die Anti-NE-

Immunaffinitätschromatographie-Säule gereinigt. Anfangs wurde vermutet, daß es sich bei OCAA-4 um NCA handelt. Weitere Untersuchungen mit verschiedenen hochspezifischen eigenen wie Referenzantisera gegen NCA konnten jedoch eine Beziehung von OCAA-4 zu NCA eindeutig ausschließen. Durch weitere Reinigung von OCAA-4 über HPLC (high performance liquid chromatography) konnte OCAA-4 isoliert werden, wobei sich ein Molekulargewicht von 40 000 Daltons bestimmen ließ. Immundiffusions-Untersuchungen zeigten, daß OCAA-4 auch keine Beziehung zu CEA, Antichymotrypsin sowie andere Serumproteine oder Tumormarker hatte. Mit Hilfe zweier weiterer Antisera (Nr. 34, 35) und des hochgereinigten Proteins konnte ebenfalls ein radioimmunologischer Assay etabliert werden, mit dem ein Normalkollektiv einen Mittelwert von $40,0 \pm 4,9$ E/ml sowie eine obere Normgrenze von 50 E/ml aufwies. Auch dieser Assay wurde erst bei Abschluß der Arbeit der klinischen Prüfung zugänglich und ergab in einem vorläufigen kleinen Kollektiv von 57 Patientinnen mit Ovarialkarzinom eine ähnliche Wertverteilung wie bei Normalpersonen ($40,9 \pm 13,2$ E/ml), wobei nur 11% über der Normgrenze von 50 E/ml zu liegen kamen. Eine Beurteilung der Brauchbarkeit dieses Tests ist deshalb noch nicht möglich.

Auch OCAA-4 wurde in vorgereinigter, aber noch nicht isolierter Form für die WHO-Studie in London zur Verfügung gestellt. Dabei wurde ebenfalls eine Reaktivität mit Anti-NCA-Serum in der Raketenimmunelektrophorese gefunden. Da dieses Referenz-Anti-NCA-Serum jedoch mit 25/30 Antigenproben der Studie reagierte und eigene wie fremde Referenz-Anti-NCA-Seren nicht mit dem

hochgereinigten OCAA-4 reagierten, darf in der Studie beschriebene Reaktion als unspezifisch angesehen werden. Ferner reagierte keines der eingesandten WHO-Studie-Antisera (n = 26) der verschiedenen Arbeitsgruppen spezifisch mit OCAA-4 bis auf einige Antisera, die ebenfalls eine breite Reaktivität und damit Unspezifität zu den zahlreichen Antigenpräparationen aufwiesen.

8.6 Andere Antigene mit möglicher klinischer Bedeutung

Da schon in Punkt 6.2.4 auf die Untersuchungsergebnisse vieler anderer Arbeitsgruppen über tumorassoziierte Ovarialkarzinom-Antigene berichtet wurde, soll hier nur auf einige relevante und durch mehrere Publikationen grösserer Untersuchungsgruppen gefundene Antigene eingegangen werden.

Die Arbeitsgruppe von Bhattacharya, die schon 1973 über ein hochmolekulares Mukoprotein mit elektrophoretischer β -Mobilität ohne Beziehung zu CEA oder Histokompatibilitätsantigenen in serösen Cystadenokarzinomen (21) sowie 1974 über verschiedene tumorassoziierte Antigene in Granulosazell- und Granulosathekazell-Karzinomen des Ovars (23) berichtete, konzentrierte ihre Untersuchungen in den folgenden Jahren auf zwei spezielle Antigene "OCAA" und "OCAA-1" (24,25).

"OCAA" (ovarian cystadenocarcinoma associated antigen) ist ein Mukoprotein-Antigen, das nur in serösen oder muzinösen Ovarialkarzinomen vorkommt, nicht aber in benignen Ovarialzystadenomen. Es handelt sich um ein saures Glykoprotein mit hohem Molekulargewicht, einem 50-60%igen Protein- und 30-40%igen Kohlenhydratgehalt. Es ist in Perchlorsäure löslich.

Für "OCAA" konnte ein Radioimmunoassay etabliert werden, der für Normalpersonen einen oberen Normgrenzwert von 10 ng/ml ergab. Erhöhte Serumspiegel wurden bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom vor allem in Stadium II und III (65%) bzw. IV (80%) gemessen, wobei die Höhe des Spiegels zu Tumormasse und klinischem Stadium korrelierte. Zusätzlich wurde ein OCAA-Anstieg vor klinischer Entdeckung eines Rezidivs gefunden. Der Test erwies sich jedoch als ungeeignet für eine Frühdiagnose; ferner wurde seine Organ-Spezifität durch das Vorkommen erhöhter Spiegel bei 30% von Patienten mit Colon-, Mamma- und Zervixkarzinom beeinträchtigt.

Als zweites interessantes Antigen dieser Arbeitsgruppe wurde "OCAA-1" beschrieben. Im Vergleich zu "OCAA" war dieses Antigen bei 90% aller Ovarialkarzinome und anderen gynäkologischen Tumoren sowie einigen Colon-, Mamma-, Pankreas- und anderen Karzinomen nachweisbar. "OCAA-1" ist perchlorsäureempfindlich, hat eine elektrophoretische β -Mobilität und kommt in entsprechenden Tumorzellen zytoplasmatisch vor. Ferner konnte eine Identität dieses Antigens mit dem Antigen OvC-1 von IMAMURA et al. (88) bewiesen werden. "OCAA-1" war auch in Schwangerenserum messbar vorhanden, weshalb es als ein neues schwangerschafts-assoziiertes Antigen angesehen wird. In der Zwischenzeit konnte die gleiche Arbeitsgruppe von Bhattacharya zwei monoklonale Antikörper (4F₄, 7A₁₀) gegen ovarielle Adenokarzinome herstellen, die ein einheitliches Antigen mit einem Molekulargewicht von 48 000 Daltons mit Concanavalin A-Bindungsfähigkeit identifizierten, das bei 90% von verschiedenen Ovarialkarzinomen und

60% von anderen Tumoren, sowohl benigner wie maligner Provenienz, nachweisbar war, nicht jedoch in normalen Erwachsenen-Geweben oder Seren (26,27). Zusätzlich wurde es in einigen fetalen Geweben (Darm, Leber) gefunden. Durch Vergleich der beiden monoklonalen Antikörper mit einem polyklonalen Anti-"OCAA-1"-Antiserum ließ sich zeigen, daß alle Antiseren gegen das gleiche Molekül und das polyklonale Antiserum sowie der monoklonale Antikörper 7A₁₀ gegen das gleiche Epitop (Antigendeterminante) gerichtet waren. Der monoklonale Antikörper erwies sich auch als sehr gut brauchbar für Immunperoxidase-Untersuchungen, wobei sich epitheliale Zellen ovarieller Karzinome stark färbten (intensive Färbung auf der Zelloberfläche und paranukleär, schwach im Zytoplasma). Zusätzlich wurden auch Mammakarzinom- und Prostata-Karzinomzellen angefärbt; keine Färbung wurde gegen normale Ovarzellen gefunden. Dies Antigen wurde als gp48 (MG 48 000) bezeichnet und wird als Differenzierungsantigen angesehen; "OCAA-1" soll ein MG um 50 000 Daltons aufweisen und dem gp 48 sehr ähnlich, aber nicht vollidentisch sein. Von den 6 von IMAMURA et al. (88) beschriebenen ovarial-tumorassozierten Antigenen konnten zwei als CEA (OvC-4) bzw. NCA (OvC-5) identifiziert werden, ein drittes als SP-3 (OvC-3); OvC-6 war ein individualspezifisches Antigen des immunisierenden Tumors, OvC-1 - wie oben beschrieben - identisch mit "OCAA-1" von Bhattacharya u. Mitarb. als neues schwangerschafts-assoziiertes Antigen, wohingegen OvC-2 bei 8/93 Ovarialkarzinomen nachweisbar war und als ein fetales oder Differenzierungsantigen angesehen wurde.

Die Arbeitsgruppe von KNAUF und URBACH berichtete erstmals 1974 über ihre Untersuchungen an Ovarialkarzinomen und beschrieb tumorspezifische Antigene (102). 1977 berichteten die Autoren erstmals über ein humanes ovarialtumorassoziertes Antigen TAA, das über Affinitätschromatographie an Concavalin-A-Sepharose und drei weiteren Immunaффinitätschromatographie-Säulen mit Antikörpern gegen Proteine in normalen adulten und fetalen Seren sowie normalem Ovarialgewebe gereinigt werden konnte (103). Dieses Antigen war aus einem Perchlorsäureextrakt von Ovarialkarzinom angereichert worden und ließ sich nach Bindung an Con A am besten mit 10%iger D-Mannose eluieren. Mit einem spezifischen Antiserum ließ sich in der Immunelektrophorese eine Präzipitatslinie in der β -Region darstellen. In einer weiteren Arbeit aus dem Jahre 1978 (104) wurde das Antigen als OCA bezeichnet und mittels Gelfiltration an Sephadex G 100 in 4 verschiedene Unterfraktionen aufgeteilt, wobei OCA im Leervolumen-Peak und nach OCB und OCC, OCD als langsamste Fraktion im niedermolekularen Bereich wanderte. Eine Kreuzreaktion zu CEA wurde mit OCA bis OCD gefunden. Durch Immunodiffusionsuntersuchungen konnte zumindest eine deutliche Verwandtschaft zwischen CEA und OCA bei ähnlicher immunelektrophoretischer β -Mobilität gesichert werden. Für dieses OCA wurde ein Radioimmunoassay entwickelt, der durch einen sehr engen Arbeitsbereich zwischen 0 und 3 ng/ml auffiel und eine Normgrenze von ca. 1,8 ng/ml hatte. Vergleichende Bestimmungen von OCA und CEA in diesem Assay maßen angeblich weniger CEA als OCA: in einer Gesamt-OCA-Charge wurde zu 48% OCA und nur 7% CEA gemessen. Der CEA-Standard Roche von

125 ng/ml ergab eine OCA-Aktivität von 57 ng/ml (46%). Serumbestimmungen mit diesem OCA-RIA bei 153 Patientinnen mit Ovarialkarzinom ergaben in 76% der Fälle erhöhte OCA-Spiegel (104). Es zeigte sich jedoch, daß die OCA-Erhöhungen nicht signifikant mit dem Erkrankungsstadium korrelierten (I: 82%, IV: 57%!!) bzw. sogar eher invers korreliert waren; ferner bestand keine Korrelation zwischen OCA-Spiegel und Tumortyp (positive Befunde zwischen 54 und 65%). Auch zwischen pathologischem Typ, Grad der Differenzierung und OCA-Spiegel ließ sich kein Zusammenhang nachweisen. Der Wert dieses Tests bei deutlicher CEA-Kreuzreaktion, wie er auch in der Londoner WHO-Studie von 1979 gesichert werden konnte, bleibt deshalb sehr fraglich, wenn auch auffälligerweise gerade in frühen Stadien relativ hohe OCA-Spiegel gefunden wurden. Es fehlen jedoch noch Untersuchungen bei Patienten mit anderen Malignomen und mit benignen gynäkologischen Erkrankungen. In einer Fortführung der Arbeiten der gleichen Arbeitsgruppe (105) wurde aus dem niedermolekularen Fraktionen von OCA ein Antigen mit einem Molekulargewicht von 70 000 Daltons (NB/70 K) mittels Perchlorsäureextraktion und ConA-Sepharose-Chromatographie isoliert, das eine elektrophoretische alpha-Mobilität aufwies und nicht in normalem Serum oder Lungenextrakt nachweisbar war sowie keinerlei Kreuzreaktivität zu CEA aufwies. Auch für dieses Antigen wurde ein Radioimmunoassay entwickelt. Nach Absorption des gegen OCA hergestellten Antiserums mit normalem Lungenextrakt blieb noch eine Reaktion gegen Colon- und Ovarialkarzinom übrig, die durch Absorption mit den entsprechenden Tumorextrakten verschwand. Durch

immunaффinitätschromatographische Reinigung des Antigens OCA (Antiserum gegen Immunpräzipitat von Anti-OCA-Serum mit Normalserum, normalem Ovar-, Lungen- und Colonkarzinomextrakt) wurde NB/70k isoliert. Serumbestimmungen von NB/70k bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom sollen die Brauchbarkeit dieses Markers gezeigt haben (106). . Weiterhin konnte über die immunhistologische Lokalisation von NB/70k berichtet werden (29). . Dabei war dieses Antigen in Tumorzellen gynäkologischer Karzinome (Ovarialkarzinom, Endometriumkarzinom) und in einer begrenzten Anzahl von Mamma-Karzinomzellen im Zytoplasma nachweisbar. Ferner sei auch auf das von BURTON et al. (45) beschriebene thermostabile Antigen TA aus Ovarial- und Endozervixkarzinom hingewiesen. Dieses Antigen wurde mittels eines Antiserums im Kolumnar-Epithel von Ovarialkarzinomen, Endozervixkarzinomen-Drüsenzellen und auch in Bronchialschleimhautdrüsenzellen sowie in Gallenkanälchen der Leber nachgewiesen. In der WHO-Studie 1979 war das von BURTON eingesandte Antiserum polyspezifisch, so daß Aussagen nicht getroffen werden konnten; in der Antigenpräparation konnte kein Protein nachgewiesen werden.

Interessant ist der Nachweis von Antigenen in verschiedenen Tumororganen mit Bezug zum Ovarialkarzinom. Dazu gehört ein von PANT et al. (138) beschriebenes colonspezifisches Antigen CAP , ferner ein von Mc NEILL et al. (124) beschriebenes Muzin-Antigen in muzinösen Zystadenomen des Ovars, das auch in Colonkarzinomschleimhaut gefunden wurde sowie neuerdings ein von PANT et al. (139) gefundenes Colon-Ovar-Tumorantigen (COTA), ein Muzinantigen, das mittels Ziegenanti-

serum gegen humanes Colonkarzinomgewebe erhalten wurde. Dieses Antigen ließ sich nur in Colonkarzinomen und muzinösen Ovarial-Adenokarzinomen nachweisen, nicht in serösen Adenokarzinomen des Ovars oder Adenokarzinomen von Lunge, Mamma, Niere und Magen oder in Normalgewebe. Es war nicht identisch mit CEA, CA 19-9 oder CSAP und wies ein Molekulargewicht zwischen 3 und 15 Millionen Daltons auf.

Ferner sei noch auf ein ovarial-karzinom-assoziiertes Urinpeptid (165), ein Glykoprotein-Antigen mit Molekulargewicht von 97 000 Daltons (97 k-GP) aus epithelialen Ovarialtumoren (143), ein schwangerschaftsassoziertes β_1 -Makroglobulin in Ovarialkarzinomzelllinien (164) sowie auf den Nachweis von speziellen Enzymerhöhungen im Serum von Patientinnen mit Ovarialkarzinom wie 2 β -Hexosaminidase (49), Galactosyl-transferase im Aszites (50), Zytidin-5'-Monophosphor-N-Acetylneuraminsäure-Hydrolase im Serum (47) oder Erhöhungen der plazentaren alkalischen Phosphatase (20,139) hingewiesen.

8.7 Ovarialkarzinom-assoziierte Antigene und monoklonale Antikörper

Eine neue Ära in der Erforschung von tumor-assoziierten Antigenen ist durch die Einführung der monoklonalen Antikörpertechnik mit Hilfe von Hybridomen eingeleitet worden (101). Neben den gegen die bisher beschriebenen und bekannten Antigene hergestellten monoklonalen Antikörpern (siehe CEA, OCAA-1) wurde ein Teil neuer Antigene überhaupt erst mit Hilfe monoklonaler Antikörper entdeckt. Im folgenden soll auf einige der wesentlichen Antigene eingegangen werden.

Im Jahre 1980 berichteten R.C. Bast u. Mitarb. vom Dana Farber Cancer Institute und der Harvard Medical School in Boston zum ersten Mal über einen monoklonalen Antikörper, der bei Immunisierung von Mäusen mit einer humanen epithelialen Ovarialkarzinomzelllinie (OVCA 433, papilläres seröses Zystadenokarzinom) erhalten worden war. Unter den zahlreichen Klonen erwies sich einer als besonders brauchbar und wurde als OC-125 benannt (IgG1-Mäuse-Immunglobulin). Dieser Antikörper reagierte mittels indirekter Immunfluoreszenz mit allen epithelialen humanen Ovarialkarzinomzelllinien sowie mit einem großen Teil kryopräservierter Tumorzellen aus dem Aszites von Ovarialkarzinom-Patientinnen, nicht jedoch mit adulten Ovarien. Weitere Untersuchungen ergaben, daß das entdeckte Antigen (CA-125) auf einem hochmolekularem Glykoprotein mit einem Mol-Gew. von über 500 000 Daltons lag. Durch ausgedehnte Immunperoxidase-Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß CA-125 in einer Vielzahl von serösen Ovarialkarzinomen (serös, clear-cell, endometroid, undifferenziert), weniger in muzinösen Ovarialkarzinomen nachweisbar war (17, 92). Aufgrund immunhistologischer Befunde in Fetalgeweben mit Abkömmlingen des Zölomepithels (Müller'sche Gänge) wurde gefolgert, daß es sich beim CA-125 um ein Differenzierungs-Antigen aus Zölomepithel-Derivaten handelt. Im Jahre 1983 entwickelte die gleiche Arbeitsgruppe unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers OC-125 einen immunoradiometrischen Assay zur Bestimmung von CA-125 in Körperflüssigkeiten (18). Mit diesem Test konnte bei Normalpersonen eine Konzentration im Serum von $11,2 \pm 5,4$ U/ml bei einer oberen Normgrenze von 35 U/ml

gemessen werden (99%iger Vertrauensgrenze für Gesunde), während ein heute häufiger verwendeter Grenzwert von 65 U/ml alle Normalpersonen und Patienten mit benignen Erkrankungen mit einer 98%igen Vertrauensgrenze einschließt. Durch ausgedehnte klinische Studien mit diesem Assay (kommerziell vertrieben durch Centocor, CIS, Mallinckrodt) konnte gezeigt werden, daß z.B. oberhalb eines Referenzwertes von 35 U/ml über 80% der Ovarialkarzinompatientenserum gegenüber nur 6% von Patienten mit benignen Erkrankungen gegeben waren. Daneben konnten jedoch auch erhöhte Inzidenzraten im Serum von Patienten mit anderen Tumoren wie z.B. Pankreaskarzinom (60%), Bronchialkarzinom (30%), gastrointestinale wie nicht g.-i.-Karzinome (26%) und colorectale Karzinome (23%) und die niedrigste Rate beim Mammakarzinom (12%) beobachtet werden (100). Für das Ovarialkarzinom wurden jedoch auch deutlich niedrigere Inzidenzraten im frühen Stadium gefunden. Es bestand aber eine gute Korrelation mit dem klinischen Verlauf. Aus einer Zusammenstellung von CA-125-Untersuchungen an 5 deutschen Universitäts-Frauenkliniken (Hamburg, Würzburg, Mainz, Köln) geht hervor, daß CA-125-Spiegel bei benignen Ovarialtumoren ebenfalls erhöht vorkommen, aber nur bis maximal 30%; bei Ovarialkarzinomen bestanden vor Therapie übereinstimmend hohe Positivitätsraten zwischen 62% und 80% sowie ähnliche hohe Raten in Verbindung mit progressiver Erkrankung, während in der Remission auffallend niedrige Raten unter 10% gemessen wurden (178).

Im Vergleich zu anderen Tumormarkern wie CEA und TPA (Tissue Polypeptid Antigen) erwies sich damit dieser Marker als der heute

Im Jahre 1980 berichteten R.C. Bast u. Mitarb. vom Dana Farber Cancer Institute und der Harvard Medical School in Boston zum ersten Mal über einen monoklonalen Antikörper, der bei Immunisierung von Mäusen mit einer humanen epithelialen Ovarialkarzinomzelllinie (OVCA 433, papilläres seröses Zystadenokarzinom) erhalten worden war. Unter den zahlreichen Klonen erwies sich einer als besonders brauchbar und wurde als OC-125 benannt (IgG1-Mäuse-Immunglobulin). Dieser Antikörper reagierte mittels indirekter Immunfluoreszenz mit allen epithelialen humanen Ovarialkarzinomzelllinien sowie mit einem großen Teil kryopräservierter Tumorzellen aus dem Aszites von Ovarialkarzinom-Patientinnen, nicht jedoch mit adulten Ovarien. Weitere Untersuchungen ergaben, daß das entdeckte Antigen (CA-125) auf einem hochmolekularem Glykoprotein mit einem Mol-Gew. von über 500 000 Daltons lag. Durch ausgedehnte Immunperoxidase-Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß CA-125 in einer Vielzahl von serösen Ovarialkarzinomen (serös, clear-cell, endometnoid, undifferenziert), weniger in muzinösen Ovarialkarzinomen nachweisbar war (17, 92). Aufgrund immunhistologischer Befunde in Fetalgeweben mit Abkömmlingen des Zölomepithels (Müller'sche Gänge) wurde gefolgert, daß es sich beim CA-125 um ein Differenzierungs-Antigen aus Zölomepithel-Derivaten handelt. Im Jahre 1983 entwickelte die gleiche Arbeitsgruppe unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers OC-125 einen immunoradiometrischen Assay zur Bestimmung von CA-125 in Körperflüssigkeiten (18). Mit diesem Test konnte bei Normalpersonen eine Konzentration im Serum von $11,2 \pm 5,4$ U/ml bei einer oberen Normgrenze von 35 U/ml

gemessen werden (99%iger Vertrauensgrenze für Gesunde), während ein heute häufiger verwendeter Grenzwert von 65 U/ml alle Normalpersonen und Patienten mit benignen Erkrankungen mit einer 98%igen Vertrauensgrenze einschließt. Durch ausgedehnte klinische Studien mit diesem Assay (kommerziell vertrieben durch Centocor, CIS, Mallinckrodt) konnte gezeigt werden, daß z.B. oberhalb eines Referenzwertes von 35 U/ml über 80% der Ovarialkarzinompatientenserien gegenüber nur 6% von Patienten mit benignen Erkrankungen gelogen waren. Daneben konnten jedoch auch erhöhte Inzidenzraten im Serum von Patienten mit anderen Tumoren wie z.B. Pankreaskarzinom (60%), Bronchialkarzinom (30%), gastrointestinale wie nicht g.-i.-Karzinome (26%) und colorectale Karzinome (23%) und die niedrigste Rate beim Mammakarzinom (12%) beobachtet werden (100). Für das Ovarialkarzinom wurden jedoch auch deutlich niedrigere Inzidenzraten im frühen Stadium gefunden. Es bestand aber eine gute Korrelation mit dem klinischen Verlauf. Aus einer Zusammenstellung von CA-125-Untersuchungen an 5 deutschen Universitäts-Frauenkliniken (Hamburg, Würzburg, Mainz, Köln) geht hervor, daß CA-125-Spiegel bei benignen Ovarialtumoren ebenfalls erhöht vorkommen, aber nur bis maximal 30%; bei Ovarialkarzinomen bestanden vor Therapie übereinstimmend hohe Positivitätsraten zwischen 62% und 80% sowie ähnliche hohe Raten in Verbindung mit progressiver Erkrankung, während in der Remission auffallend niedrige Raten unter 10% gemessen wurden (178).

Im Vergleich zu anderen Tumormarkern wie CEA und TPA (Tissue Polypeptid Antigen) erwies sich damit dieser Marker als der heute

wesentliche Ovarialkarzinommarker.

Ferner sei auf einen zweiten Marker hingewiesen, der ebenfalls nur mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers entdeckt wurde und der als CA 19-9 bezeichnet wird. Dieser Marker wurde 1978 zum ersten Mal von KOPROWSKI et al. vom Wistar-Institut in Philadelphia beschrieben (107). Er war durch Immunisierung von Mäusen mit einer colorectalen Karzinomzelllinie (SW 1116) hergestellt worden. CA 19-9 oder GICA (gastrointestinal cancer antigen) konnte mit Hilfe dieses monoklonalen Antikörpers (IgG1-Mäuse-immunglobulin) als ein Monosialogangliosid (Sialylderivat der Lacto-N-Fucopentaose II, einem Hapten der menschlichen Lewis-A-Blutgruppenderminante) identifiziert werden (121).

Immunhistologisch war CA-19-9 mit Hilfe des Antikörpers vor allem im Colon-Pankreas- und Magenkarzinomen, jedoch auch in muzinösen Ovarialkarzinomen nachweisbar(5, 46). Das im Serum mit Hilfe eines immunoradiometrischen Assays meßbare Korrelat besteht aus einem hochmolekularen Muzin mit einem MG über 10^6 Daltons und kann inzwischen mit Hilfe eines kommerziellen Tests gemessen werden, der eine obere Normgrenze von ca. 37 U/ml besitzt¹. Hohe und höchste CA 19-9-Spiegel und hohe Inzidenzraten pathologischer Spiegel wurden im Serum von Patienten mit Pankreas-karzinom (80%), Colonkarzinom (Dukes D: 60%, C 47%, A/B 3-7%), Leberzellkarzinom (50%) und Magenkarzinom (60%) bei nur niedrigen Inzidenzarten unter 10% beim Bronchial- und Mamma-Karzinom gefunden (55). Ferner wurden auch erhöhte Spiegel bei Patientinnen mit muzinösem Ovarialkarzinom gemessen, insgesamt bei 40% von Ovarialkarzinom-Patienten im Gewebe und bei ca. 20% im Serum.

¹ Centocor, Cis, Mallinckrodt, Abbot

Neuere Untersuchungen konnten aber auch zeigen, daß sowohl CA-125 wie CA 19-9 bei benignen Leber- und Pankreaserkrankungen in Abhängigkeit von der Schwere der Erkrankung in 10-30% transitorisch deutlich erhöhte Spiegel bis 100 und mehr U/ml aufweisen können, während bei malignen Erkrankungen Spiegel über 1000 und mehr U/ml keine Seltenheit darstellen (55, 99). Dennoch bleibt festzuhalten, daß CA-125 der heute wichtigste Tumormarker beim Ovarialkarzinom darstellt und CA 19-9 zumindest für muzinöse Ovarialkarzinome ein unverzichtbarer Marker ist.

Ferner sei darauf hingewiesen, daß inzwischen andere Untersucher ebenfalls über monoklonale Antikörper gegen Ovarialkarzinome berichteten. So beschrieben TAGLIABUE et al. (167) zwei monoklonale Antikörper MOv1 und MOv2 gegen muzinöse Ovarial-Zystadenokarzinom-Membranpräparationen, die zwei unterschiedliche Epitope auf Molekülen maligner und benigner ovarieller muzinöser Tumoren sowie auch gegen Colonschleimhautdrüsen erkannten. Das von MOv2 entdeckte Antigen konnte auch in Karzinomen der Lunge, des Colons, des Magens und der Mamma sowie in gastrointestinalen Drüsenlumina normaler laktierender Mamma entdeckt werden (167). Eine weitere Untersuchung der entdeckten Antigene ergab, daß es sich dabei um Epitope von Kohlenhydratresten von hochmolekularen Antigenen handelte, die möglicherweise Glykolipide darstellen (127). Während MOv1 vorwiegend gegen ein Muzin gerichtet war, erkannte MOv2 ein Epitop auf einem Muzin und auf einem Glykolipid. Mit Hilfe eines radioimmunometrischen Assays konnte bisher ^{mit} MOv1 kein positiver Befund in Aszitesflüssigkeiten von Patientinnen mit Ovarial-

wesentliche Ovarialkarzinommarker.

Ferner sei auf einen zweiten Marker hingewiesen, der ebenfalls nur mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers entdeckt wurde und der als CA 19-9 bezeichnet wird. Dieser Marker wurde 1978 zum ersten Mal von KOPROWSKI et al. vom Wistar-Institut in Philadelphia beschrieben (107). Er war durch Immunisierung von Mäusen mit einer colorectalen Karzinomzelllinie (SW 1116) hergestellt worden. CA 19-9 oder GICA (gastrointestinal cancer antigen) konnte mit Hilfe dieses monoklonalen Antikörpers (IgG1-Mäuse-immunglobulin) als ein Monosialogangliosid (Sialylderivat der Lacto-N-Fucopentaose II, einem Hapten der menschlichen Lewis-A-Blutgruppenderminante) identifiziert werden (121).

Immunhistologisch war CA-19-9 mit Hilfe des Antikörpers vor allem im Colon-Pankreas- und Magenkarzinomen, jedoch auch in muzinösen Ovarialkarzinomen nachweisbar(5, 46). Das im Serum mit Hilfe eines immunoradiometrischen Assays meßbare Korrelat besteht aus einem hochmolekularen Muzin mit einem MG über 10^6 Daltons und kann inzwischen mit Hilfe eines kommerziellen Tests gemessen werden, der eine obere Normgrenze von ca. 37 U/ml besitzt¹. Hohe und höchste CA 19-9-Spiegel und hohe Inzidenzraten pathologischer Spiegel wurden im Serum von Patienten mit Pankreas-karzinom (80%), Colonkarzinom (Dukes D: 60%, C 47%, A/B 3-7%), Leberzellkarzinom (50%) und Magenkarzinom (60%) bei nur niedrigen Inzidenzarten unter 10% beim Bronchial- und Mamma-Karzinom gefunden (55). Ferner wurden auch erhöhte Spiegel bei Patientinnen mit muzinösem Ovarialkarzinom gemessen, insgesamt bei 40% von Ovarialkarzinom-Patienten im Gewebe und bei ca. 20% im Serum.

¹ Centocor, Cis, Mallinckrodt, Abbot

Neuere Untersuchungen konnten aber auch zeigen, daß sowohl CA-125 wie CA 19-9 bei benignen Leber- und Pankreaserkrankungen in Abhängigkeit von der Schwere der Erkrankung in 10-30% transitorisch deutlich erhöhte Spiegel bis 100 und mehr U/ml aufweisen können, während bei malignen Erkrankungen Spiegel über 1000 und mehr U/ml keine Seltenheit darstellen (55, 99). Dennoch bleibt festzuhalten, daß CA-125 der heute wichtigste Tumormarker beim Ovarialkarzinom darstellt und CA 19-9 zumindest für muzinöse Ovarialkarzinome ein unverzichtbarer Marker ist.

Ferner sei darauf hingewiesen, daß inzwischen andere Untersucher ebenfalls über monoklonale Antikörper gegen Ovarialkarzinome berichteten. So beschrieben TAGLIABUE et al. (167) zwei monoklonale Antikörper MOv1 und MOv2 gegen muzinöse Ovarial-Zystadenokarzinom-Membranpräparationen, die zwei unterschiedliche Epitope auf Molekülen maligner und benigner ovarieller muzinöser Tumoren sowie auch gegen Colonschleimhautdrüsen erkannten. Das von MOv2 entdeckte Antigen konnte auch in Karzinomen der Lunge, des Colons, des Magens und der Mamma sowie in gastrointestinalen Drüsenlumina normaler laktierender Mamma entdeckt werden (167). Eine weitere Untersuchung der entdeckten Antigene ergab, daß es sich dabei um Epitope von Kohlenhydratresten von hochmolekularen Antigenen handelte, die möglicherweise Glykolipide darstellen (127). Während MOv1 vorwiegend gegen ein Muzin gerichtet war, erkannte MOv2 ein Epitop auf einem Muzin und auf einem Glykolipid. Mit Hilfe eines radioimmunometrischen Assays konnte bisher ^{mit} MOv1 kein positiver Befund in Aszitesflüssigkeiten von Patientinnen mit Ovarial-

karzinomen erhoben werden, mit MOV2 jedoch in 8 von 10 Aszitesflüssigkeiten von Patientinnen mit gut differenziertem und 5 von 11 Aszitesflüssigkeiten mit gering diff. Ovarialkarzinom (127).

Eine wesentliche Bereicherung in der Tumordiagnostik wurde durch die Entwicklung der sogenannten Radioimmunodetektion oder Radioimmunszintigraphie erreicht, d.h. der szintigraphischen Aufspürung okkult^{er} Tumorrezidive oder -Metastasen mit Hilfe radioaktiv markierter Antikörper gegen Tumormarker.

Es ist zu erwarten, daß im Laufe der nächsten Monate und Jahre noch weitere monoklonale Antikörper auch gegen verschiedene ovarialkarzinom-assoziierte Antigene entdeckt werden und vielleicht auch als Marker für das Radioimaging verwandt als auch zur Messung frei zirkulierender Antigene eingesetzt werden können (70).

GOLDENBERG et al. (75) berichteten als erste über ihren erfolgreichen Einsatz von radioaktiv markierten polyklonalen Anti-CEA-Antikörpern (I^{131}) gegen verschiedene Tumoren in Patienten mit wie ohne erhöhten CEA-Titern. Dabei wurden auch Ovarialkarzinom-Patientinnen untersucht. Bei 19 Patientinnen konnten Befunde erhoben werden, davon bei 10 von 10 Primärtumoren und 11 von 14 Sekundort^{en}, insgesamt mit einer Sensitivität von 90%. Die dabei beobachtete Spezifität der Methode lag ebenfalls bei ca. 90%. Erst kürzlich berichtete die Arbeitsgruppe von EPENETOS et al. (64) aus London über den erfolgreichen Nachweis eines kleinen Lokalrezidivs eines Ovarialkarzinoms im Becken mit Hilfe eines I^{123} -markierten monoklonalen Anti-

körpers gegen HMFG2 (human milk fat globulin-Antigen).

Die Größe des resezierten Rezidivknotens, der weder durch Sonographie noch Computertomographie entdeckt werden konnte, betrug 0,8 cm im Durchmesser.

ZUSAMMENFASSUNG

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit befaßt sich mit der Pathologie und Klinik gynäkologischer Tumoren im allgemeinen und des Ovarialkarzinoms im besonderen sowie mit einem Überblick über bedeutsame klinisch relevante Tumormarker (AFP, CEA, Ferritin u.a.).

Im zweiten Teil wird über eigene experimentelle Untersuchungen berichtet. Es wurden 4 Perchlorsäure- (OEP I, II, III, IV) und eine saline (OES) Extraktion von gepoolten überwiegenden Ovarialzystadenokarzinomen (N = 11, Tab. 6) sowie 2 saline Extraktionen von gepooltem normalen Ovarialgewebe (N = 18, ONS, Tab. 6) hergestellt und diese nach Dialyse, Konzentrierung, Entsalzung und Ultrafiltration lyophilisiert. Die lyophilisierten Tumorextrakte wurden nach Auflösung in Puffer durch Gelfiltration über Sepharose 6B und Sephadex G200 in 4-6 Unterfraktionen unterschiedlicher Molekulargewichte aufgeteilt. Mit Tumorgesamtextrakten und einzelnen Unterfraktionen wurden 23 Kaninchen (Tab. 9) immunisiert und die erhaltenen Antiseren nach Absorption mit Normalserum, A/B-Erythrozyten und partiell mit normalem Ovarialgewebsextrakt auf tumorassoziierte Antigene untersucht. Mittels Immunodiffusion konnten folgende ovarial-karzinom-assoziierte Antigene (OCAA) gefunden werden:

1. ein als (Iso)ferritin identifiziertes Antigen (OCAA-1) mit einem Molekulargewicht zwischen 10^5 und 10^6 Daltons (Antiseren-Nr. 2, 5, 9);

2. ein als CEA identifiziertes Protein (OCAA-2 = CEA-OV) mit einem Molekulargewicht um 2×10^5 und einer elektrophoretischen β -Mobilität (Antiserum Nr. 10). OCAA-2 konnte mittels Immunaффinitätschromatographie über Sepharose 4 B mit angekoppeltem Anti-CEA-IgG weiter isoliert und zur Herstellung eines hochtitrigen Anti-CEA-OV-Serums und eines organbezogenen CEA-OV-Radioimmunoassays verwandt werden. Organtumor-CEA-OV und der entsprechende Antikörper zeigten bei Prüfung in der Immunodiffusion ähnliches Verhalten wie entsprechende CEA- und Anti-CEA-Präparationen anderer Tumoren (Colon, Pankreas, Lunge, Mamma) im Sinne einer immunologischen Identität und im Radioimmunoassay parallele Antikörperverdünnungskurven und übereinstimmende Standard-Inhibitionskurven von Ovarial (CEA-OV)- und Colonkarzinom-CEA (CEA-CO). Ferner ergaben CEA-Bestimmungen in Seren gemischter Tumorpatientenkollektive und unter Verwendung des CEA-OV- wie CEA-CO-Radioimmunoassay-Systems praktisch übereinstimmende Werte ohne signifikante Unterschiede ($r_s = 0,992$, $p \leq 0,001$, $N = 91$).

3. Als weiteres Antigen (OCAA-3) wurde ein noch nicht identifiziertes hochmolekulares Antigen (Mol.-Gewicht $\geq 10^6$) mit bevorzugter Anreicherung in OEP und elektrophoretischer β -Mobilität gefunden. Es war immunologisch mit verschiedenen Anti-Ovarialgewebsextrakt-Antiseren (Nr. 5, 10, 15) sowie mit einem kreuzreagierenden Antiserum gegen normalen Colongewebsextrakt (Anti-NE) nachweisbar und nicht identisch mit Serumproteinen, AFP, CEA, NCA, Ferritin, Lactoferrin, Lysozym, SP-1, SP-3,

Antichymotrypsin, Fibrinogen und Fibronectin. OCAA-3 konnte immunaffinitätschromatographisch weiter isoliert und zur Herstellung eines hochspezifischen Antiserums (Nr. 31) und eines Radioimmunoassays verwandt werden (spez. Aktivität $9 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$; 1.Ak Nr. 31 IgG 1:40 000; 2.Ak Anti-Kaninchen-IgG-Antiserum 1:30), der im Logit-Log-Plot eine durchgehende lineare Inhibitionsgerade ergab.

4. Als viertes Antigen (OCAA-4) konnte ein niedermolekulares Antigen mit einem Molekulargewicht von 40 000 Daltons mit verschiedenen Antiseren (Nr. 3, 15, 34, 35, Anti-NE) entdeckt werden, das noch nicht identifiziert werden konnte und nicht mit NCA, CEA, Antichymotrypsin oder anderen niedermolekularen Serumproteinen übereinstimmte. OCAA-4 wurde mittels Immunaffinitätschromatographie und HPLC isoliert und zusammen mit einem Antikörper (Nr. 34) zur Herstellung eines Radioimmunoassays verwandt (spez. Aktivität $5 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$).

Serumbestimmungen bei Normalpersonen und 164 Patientinnen mit Ovarialkarzinom verschiedener Stadien I-IV ergaben für Alpha-Fetoprotein (laboreigener RIA, obere Normgrenze 15 ng/ml) nur bei 8 Patienten erhöhte Werte. Für CEA (= OCAA-2, laboreigener CEA-CO-RIA, obere Normgrenze 3 ng/ml), das wegen übereinstimmender Ergebnisse zwischen CEA-OV- und Referenz-CEA-CO-RIA mit letzterem Assay bestimmt wurde, ergaben sich für Stadium I-IV ansteigende CEA-Serumspiegel und zunehmende Inzidenzraten pathologischer Werte von 9%, 27%, 12% und 30%. Für OCAA-1 (Ferritin, kommerzieller immunoradiometrischer Assay, obere

Normgrenze bei 250 ng/ml) stiegen die Inzidenzraten pathologischer Spiegel für Stadium I bis IV von 34% über 56%, 65% nach 82% an mit signifikanten Unterschieden zwischen Stadium I nach II, III und IV ($p \leq 0,001$). Für OCAA-3 (obere Normgrenze 16 E/ml) zeigte sich in 296 Seren von Patientinnen mit Ovarialkarzinom ein Median von 7,2 E/ml mit nur 11% pathologischer Werte bis 42 E/ml. Ebenso konnte für OCAA-4 (obere Normgrenze 50 E/ml) in 57 untersuchten Seren ein Mittelwert von $40,9 \pm 13,2$ E/ml und nur für 11% der Werte eine pathologische Konzentration gefunden werden.

Aufgrund der Ergebnisse erwiesen sich von den untersuchten Parametern Ferritin (OCAA-1) und mit Einschränkung CEA (OCAA-2) als brauchbare Marker zur Therapie- und Verlaufskontrolle des Ovarialkarzinoms, wohingegen die neuen Antigene OCAA-3 und OCAA-4 nicht geeignet waren.

In der folgenden Diskussion werden die eigenen Ergebnisse mit den Befunden anderer Untersucherguppen verglichen. Ferner wird auf weitere von anderen Autoren beschriebene brauchbare oder fragliche Tumormarker sowie auch neue mit Hilfe monoklonaler Antikörper identifizierte Antigene und ihre klinische Bedeutung eingegangen.

Tab. 1:

Retentionszysten: Polyzystische Ovarien
Follikelzysten
CL-Zysten
Parovarialzysten

Entzündliche Adnex-Tumoren, Pseudotumoren

Echte Blastome: Epitheliale Tumoren: 65-75% aller Ov.-Tumoren	gutartig		maligne
	seröse Kystome		seröse Kystadenokarzinome (40%)
	muzinöse Kystome		muzinöse Kystadenokarzinome (10%)
	endometrioid, part. zystische Ov.-Tumoren		endometrioid Adenokarzinome (20%)
			prim.undiffer. Karzinome (meist solide Tumoren) (10%)
			metastatische Ov.-Karzinome (v.Korpus, Mamma Intestinaltrakt) (6%)
Tumoren des gonadalen Stromas etwa 4%	Granulosazell-tumoren	Östrogen-aktivität	klinisch mal. Granul.-Tumoren mal.Thekazelltum.
	Thekazell-tumoren		
	Arrhenoblastome	Androgen-aktivität	Arrhenoblastome mit malignem Verlauf Mesenchymome mit malignem Verlauf
	Mesenchymome		
Keimzelltumoren etwa 15%	Dermoide gutartige Teratome		Disgerminome maligne Teratome
Kongenitale Resttumoren	Brenner-Tumoren		maligne entartete Brenner-Tumoren
Bindegewebige Tumoren etwa 5%	Fibrome	z.T.m.Aszites u. Pleuraerguß (Meigs)	Sarkome

Tab. 2: Stadieneinteilung der FIGO beim Ovarialkarzinom

Stadium	Beschreibung
I a	Tumor begrenzt auf ein Ovar, kein Aszites
I b	beide Ovarien befallen, kein Aszites
I c	Befall eines oder beider Ovarien; Aszites mit Tumorzellen
II	Tumorausdehnung im Becken
II a	Infiltration von Uterus und/oder Tuben
II b	Befall des Beckengewebes oder anderer Beckenorgane
III	ausgedehnte peritoneale Metastasierung (Netz, Dünndarm u.a.)
IV	Fernmetastasen außerhalb des Peritonealraumes

Das Vorhandensein von Aszites hat keinen Einfluß auf die Einstufung der Stadien II, III und IV.

Klassifizierung nach TNM

TIS	Präinvasives Karzinom (Carcinoma in situ)
TX	Tumor nicht zu erreichen (keine Laparotomie)
T 1	Tumor auf ein Ovar beschränkt
T 2	Tumor hat beide Ovarien befallen
T 3	Uterus und/oder Tuben mitbefallen
T 4	Ausbreitung des Tumors auf Nachbargewebe
N 0	keine veränderten paraaortalen Lymphknoten
N 1	veränderte paraaortale Lymphknoten
NX	die regionalen Lymphknoten werden nicht erreicht
M 0	Fernmetastasen nicht vorhanden
M 1	Implantations- oder sonstige Metastasen vorhanden
M 1 a	Metastasen allein im kleinen Becken
M 1 b	Metastasen im Peritonealraum: Netz, Dünndarm, Mesenterium, Leber oder andere Eingeweideorgane
M 1 c	Metastasen außerhalb der Peritonealhöhle, einschließlich anderer Lymphknotenmetastasen als den paraaortalen Lymphknoten

Malignitätsgrad

G 1	Tumor von geringer Malignität
G 2	Tumor von deutlicher Malignität

Stadieneinteilung

Stadium I a:	T 1	N 0	M 0	
Stadium I b:	T 2	N 0	M 0	
Stadium II a:	T 3	N 0	M 0	
Stadium II b:	T 4	N 0	M 0	oder jedes M 1 a
Stadium III :	jedes N 1			oder jedes M 1 b
Stadium IV :				jedes M 1 c

Tab. 3 a: Serum-CEA-Spiegel von Patientinnen mit einem gynäkologischen Tumor in Abhängigkeit von Histologie und Differenzierungsgrad

Autor Land, Jahr	Histologie/Diff.	N	Pos. Rate %
van Nagell et al., USA, 1978 (132)	Ovarialkarzinom		
	muzinös	19	53%
	serös	26	31%
	noch diff. gering diff.	18 13	30% 54%
Khoo & Mackay Australien, 1976 (95)	Ovarialkarzinom		
	noch diff. gering diff.	35 38	43% 94%
van Nagell et al., USA, 1977 (131)	Endometriumkarzinom		
	noch diff. gering diff.	23 9	22% 67%
van Nagell et al., USA, 1978 (133)	Uteruskarzinom		
	Adenokarzinom	30	60%
	squamöses Karzinom	69	48%
	noch diff. gering diff.	66 59	36% 48%

Tab. 3 b: CEA-Serumspiegel von Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom in Abhängigkeit vom Stadium der Erkrankung

Autor Land, Jahr	Stadium	Nr.	Pos.Rate %
KHOO et al. Australia, 1976 (95)	I + II	51	49%
	III	37	78%
	IV	21	90%
DISAIA et al. USA, 1977 (58)	I + II	23	30%
	III + IV	88	60%
	Rezidiv	21	62%
VAN NAGELL et al. USA, 1978 (132)	I + II	20	40%
	III + IV	25	40%
SCHNABL et al. BRD, 1980	I + II	80	36,2%
	III + IV	84	41,7%

KLINISCHE BEDEUTUNG VON CEA (I)

Erstuntersuchung bei vorselektivem Patientenkollektiv (Pat. mit gastrointestinalen Beschwerden) zusammen mit Darm-Röntgen-Untersuchungen etc.

CEA häufig positiv bei Pat. mit Pankreas-Ca (+Rö, Cholangiogr., etc.)

Verbesserung der Früherkennung von Dickdarntumoren:

Kombination radiolog. Colon-Untersuchung + CEA-Spiegelbestimmung

CEA-Spiegel bei nicht-malignen Erkrankungen oft transitorisch und niedriger

Hohe CEA-Spiegel vorwiegend bei Tumorpatienten (Dickdarm/Pankreas)

Negativer CEA-Befund schließt eine Tumorerkrankung nicht aus!

Urin-CEA-Spiegel-Erhöhung bei Patienten mit Blasenkarzinom

Therapie- und Verlaufskontrolle bei bekannter Tumordiagnose (post-op., unter Chemo- bzw. Radiotherapie)

Besonders bei Patienten mit Dickdarm-, Magen-, Pankreas-, Bronchial-, Mamma- und Blasen-Karzinom.

Ausgangs-CEA-Spiegel-Bestimmung vor Behandlung empfehlenswert

Prognostisch: CEA-Spiegel über 20 ng/ml häufiger bei Tumorausbreitung

Verlaufskontrolle (CEA-Serienbestimmungen):

CEA-Spiegelabfall (1-4 Wochen): Gute Korrelation mit vollständiger Resektion (G.I.-, Mamma-, Bronchial-, Urothelial-, Gynäkol.Tumoren)

Konstant erhöhter CEA-Spiegel: V.a. unvollständige Tumoresektion und/oder Metastasierung

CEA-Spiegel-Anstieg: V.a. Progression

CEA-Spiegel-Wiederanstieg nach Normalisierung: V.a. Rezidiv und fortschreitendes Wachstum (Zeitintervall CEA-Spiegelanstieg - andere Zeichen: 2 Wochen bis 10 Monate)

Tab. 5: Erhöhungen des Serum-Ferritin-Spiegels
bei Patienten mit malignen Erkrankungen

Leukämien (Aml, All, CML)	40 - 95%
M. Hodgkin	30 - 70%
Non-Hodgkin-Lymphome	30 - 60%
Plasmozytom	25 - 70%
Prim. Leberzell-Karzinom	40 - 95%
Mamma-Karzinom	25 - 90%
Keimzelltumoren	30 - 60%
Bronchial-Karzinom	60 - 80%
Pankreas-Karzinom	70 - 80%
Gastrointest. Karzinome	20 - 45%
Neuroblastom	41%
Ovarial-Karzinom	67%
Urogenital-Karzinom	16%
Nierenkarzinom	72%

(114)

Tab. 6: Ergebnisse der Gewebsextraktion

Extr.	Tumor-N	Hist.	Meth.	Naßgew.	Gew.lyoph.	Extrakt
I	2	2 SCACA	salin PCA	528 g	5,5 g 690 mg	OES I OEP I
II	3	1 SCACA 1 ACA 1 MCACA	PCA	650 g	900 mg	OEP II
III	3	1 PACA 1 ACA 1 CACA	PCA	444 g	600 mg	OEP III
IV	3	2 SCACA 1 ACA	PCA	2011 g	4,5 g	OEP IV

Normalgewebsextrakt histologisch tumorfrei

I	10		salin	27 g	800 mg	ONES I
II	8		salin	22 g	600 mg	ONES II

SCACA seröses Zystadenokarzinom

ACA gering differenziertes Adenokarzinom

MCACA muzinöses Zystadenokarzinom

Tab. 2:

Nr.	Alter	Stadium	CEA ng/ml	AFP ng/ml	Ferritin ng/ml	Hb g%	Hb _E pg	Ery ³ mio/mm	BKS
1	82	I c	2	43	268	12,8	32	4,0	54/94
2	59	I a	2,8	12	111	15,7	30,8	5,1	10/21
3	55	III	2	3	193	14,7	31,3	4,7	14/42
4	58	I a	2	5	410	13,3	31,7	4,2	46/91
5	53	I c	3	4	111	17,4	32	5,5	2/15
6	52	II	2	5	320	12,1	33	3,7	25/65
7	73	II	2	5	117	12,4	25,8	4,8	52/83
8	67	I c	2	5	410	14,7	27,7	5,3	9/17
9	79	IV	3,3	5	364	14	26,9	5,2	55/92
10	60	IV	2	3	700	8,1	32,4	2,5	
11	44	II a	2	5	202	12,5	32,9	3,8	19/55
12	65	II b	2	7	1193	13,1	37,4	3,5	110/135
13	48	IV	4	4,4	277	13,3	27,7	4,8	8/25
14	66	IV	2	6	1528	12,4	28,8	4,3	67/107
15	55	I b	2	4	195	13,5	32,1	4,2	6/20
16	52	II a	2	6	147	14,7	31,3	4,7	25/56
17	60	III	2	11	447	11,4	33,5	3,4	55/95
18	51	II b	2	4	1073	14,1	31,3	4,5	17/37

Nr.	Alter	Stadium	CEA ng/ml	AFP ng/ml	Ferritin ng/ml	Hb g%	Hb _E pg	Ery ³ mio/mm ³	BKS
19	66	II b	2	4	259	12,7	29,5	4,3	54/85
20	63	I a	2	3	110	13,3	27,1	4,9	12/42
21	55	I a	2	4	214	13,8	32,1	4,3	36/50
22	52	I c	2	3	419	12,4	29,5	4,2	24/52
23	74	IV	594	6	637	8,7	25,6	3,4	116/142
24	62	I c	2	2	513	16,6	33,2	5,0	6/18
25	28	I c	2	2	111	13,9	30,4	4,58	9/26
26	66	I c	2	2	755	10,1	28,1	3,6	62/95
27	41	I a	2	4	235	13,2	30,7	4,3	8/21
28	27	I a	2	4	137	13,5	27,6	4,9	13/32
29	62	II b	2	5	398	13,1	34,5	3,8	11/28
30	57	II b	2	7	232	14,1	32,1	4,4	13/45
31	61	I a	3,9	3	246	13,3	31,7	4,2	4/15
32	56	IV	3,1	7	1266	13,1	29,8	4,4	42/78
33	46	IV	16	4	796	9,2	23,6	3,9	79/118
34	59	III	2	5	280	14,8	29,6	5,0	9/25
35	70	III	2	2	1247	12,4	28,8	4,3	24/36
36	45	I a	2	12	307	14,0	24,1	5,8	2/8

Fortsetzung Tab. 7

Nr.	Alter	Stadium	CEA ng/ml	AFP ng/ml	Ferritin ng/ml	Hb g%	Hb _E pg	Ery mio/mm ³	BKS
37	56	IV	3,1	3	907	10,1	28,1	3,6	32/58
38	68	III	2	6	820	10,1	32,3	3,1	89/150
39	69	III	6	19	979	11,1	31,7	3,5	75/123
40	65	IV	3,1	3	496	12,6	28,0	4,5	51/82
41	55	I a	2	6	9	12,5	27,8	4,5	25/48
42	58	I a	2	10	105	15,0	32,6	4,6	13/42
43	69	I a	2	8	182	14,1	32,1	4,4	23/60
44	64	II b	2	3	980	12,5	24,5	5,1	58/108
45	55	IV	2	3	444	11,1	31,7	3,5	55/93
46	74	I a	3	5	227	11,1	31,7	3,5	40/84
47	56	I a	4,6	4	134	13,9	31,6	4,4	9/31
48	60	IV	2	9	158	11,2	26,1	4,3	45/100
49	53	IV	2	4	610	9,3	26,6	3,5	84/125
50	66	I a	2	3	27	11,2	28,7	3,9	8/30
51	75	III	2	4	197	12,5	37,9	3,3	95/145
52	64	I c	2	8	177	15,2	29,2	5,2	9/23
53	32	II b	12	3	106	12,5	24,5	5,1	24/37
54	71	III	2	6	123	13,7	30,4	4,5	36/67

Nr.	Alter	Stadium	CEA ng/ml	APP ng/ml	Ferritin ng/ml	Hb g%	Hb _E pg	Ery ³ mio/mm ³	BKS
55	61	IV	2	2	337	13,0	26,5	4,9	6/22
56	68	IV	2	7	464	12,1	37,8	3,2	23/47
57	64	I a	2	3	447	13,0	26,5	4,9	14/32
58	71	IV	2	6	412	14,1	33,6	4,2	3/11
59	55	I c	2,9	3	103	11,2	26,1	4,3	13/42
60	52	IV	2	7	83	12,3	29,9	4,1	28/58
61	68	I b	2	3	152	14,1	33,6	4,2	10/25
62	58	I b	2	3	1782	12,8	29,8	4,3	71/106
63	56	IV	2	8	399	11,6	29,0	4,0	18/50
64	52	II b	3,7	11	117	15	31,3	4,8	11/25
65	72	IV	4,7	4	543	11,2	28,7	3,9	58/118
66	60	IV	2	6	1518	11,4	30,0	3,8	68/110
67	65	II	2	4	581	12,5	37,9	3,3	23/60
68	33	III	2	3	290	12,3	29,9	4,1	13/42
69	51	II b	3,5	3	255	14,7	35,8	4,1	3/7
70	38	I c	14	7	121	13,2	29,3	4,5	18/43
71	67	I b	2	12	456	14,6	29,2	5,0	21/37
72	70	II b	2,8	4	362	11,4	30,0	3,8	28/58
73	46	IV	2	3	138	12,0	28,6	4,2	44/80
74	54	I a	4,5	6	270	14,8	31,5	4,7	14/35

Fortsetzung Tab. 7

Nr.	Alter	Stadium	CEA ng/ml	AFP ng/ml	Ferritin ng/ml	Hb g%	Hb _E pg	Ery ₃ mio/mm	BKS
75	59	IV	2	5	573	12,8	33,7	3,8	71/118
76	62	IV	2	3	119	13,4	31,9	4,2	35/61
77	70	I a	2,1	3	191	14,1	30,7	4,6	9/30
78	56	IV	2	15	668	14,1	33,6	4,2	12/21
79	68	I a	2	5	296	14,5	30,2	4,8	39/77
80	75	IV	2	8	466	11,8	30,3	3,9	27/60
81	74	IV	2	4	662	14,8	34,4	4,3	40/67
82	72	II b	2	4	816	11,6	34,1	3,4	54/98
83	62	IV	2	8	327	14	29,2	4,8	24/56
84	85	I a	2	3	156	13,9	31,6	4,4	9/31
85	67	II b	3,2	4	346	12,8	33,7	3,8	18/43
86	57	IV	3,9	2	230	15,7	30,8	5,1	11/26
87	87	IV	2	3	542	14,0	31,1	4,5	10/26
88	63	IV	2	3	2514	11,4	39,3	2,9	55/98
89	50	IV	2	25	575	12,7	32,3	3,9	130/140
90	53	I c	2,3	3	167	11,6	34,1	3,4	12/21
91	67	I c	2	3	156	15,2	30,4	5,0	10/37
92	47	II b	2	4	154	14,0	27,5	5,1	35/63

Nr.	Alter	Stadium	CEA ng/ml	AFP ng/ml	Ferritin ng/ml	Hb g%	Hb _E pg	Ery ₃ mio/mm	BKS
93	51	IV	2	7	108	12,3	27,3	4,5	110/150
94	45	III	9	4	505	8,5	23,6	3,6	125/132
95	73	IV	5,7	2	294	11,8	25,7	4,6	16/37
96	58	IV	2	6	157	10,9	31,1	3,5	102/125
97	66	II a	2	145	1845	10,3	27,8	3,7	93/145
98	51	IV	2	3	328	14,5	32,2	4,5	16/44
99	59	III	2	3	524	14,9	31,7	4,7	7/17
100	69	IV	8	2	397	15,6	30,6	5,1	24/36
101	58	I c	2	68	261	14,0	31,1	4,5	14/26
102	56	IV	2	4	496	11,0	26,2	4,2	19/37
103	66	IV	3,6	4	1082	9,6	29,1	3,3	21/52
104	76	IV	2	3	871	11,8	25,7	4,6	43/71
105	70	IV	133	4	311	10,0	27,0	3,7	94/131
106	25	IV	2	3	330	13,6	33,2	4,1	27/64
107	71	II b	2	3	239	12,1	33,6	3,6	34/74
108	49	III	2	4	142	13,0	30,2	4,3	80/120
109	57	IV	2	5,7	1622	9,2	28,8	3,2	65/102
110	35	I a	2	3	154	14,7	29,4	5,0	18/43

Fortsetzung Tab. 5

Nr.	Alter	Stadium	CEA ng/ml	AFP ng/ml	Ferritin ng/ml	Hb g%	Hb _E pg	Ery ³ mio/mm ³	BKS
111	78	I c	2	6	354	14,1	32,1	4,4	15/41
112	58	IV	2,6	6	1075	13,5	34,6	3,9	54/99
113	76	IV	2	3	265	13,7	31,9	4,3	25/56
114	57	I a	2	5	159	15,0	32,6	4,6	18/38
115	52	I c	2	5	73	14,2	31,6	4,5	12/27
116	58	I c	2	4	192	13,4	28,5	4,7	5/9
117	43	IV	2	6	256	14,1	32,1	4,4	9/24
118	69	IV	4	8	300	11,3	30,5	3,7	16/46
119	57	IV	2	2	284	8,1	27,9	2,9	75/120
120	69	I c	2	2	616	15,2	31,0	4,9	36/74
121	56	I a	2	2	203	13,9	32,3	4,3	4/15
122	67	II b	2	10	163	12,2	30,5	4,0	25/45
123	45	IV	2	4	539	13,2	32,2	4,1	24/52
124	61	I a	2,4	2	402	13,5	27,6	4,9	21/32
125	65	IV	2	24	139	13,6	32,4	4,2	24/60
126	60	IV	2	3	207	13,3	35,0	3,8	25/55
127	65	II a	18	7	630	9,6	22,9	4,2	40/80
128	36	IV	4	2	297	13,2	35,7	3,7	15/35

Nr.	Alter	Stadium	CEA ng/ml	AFP ng/ml	Ferritin ng/ml	Hb g%	Hb _E pg	Ery ₃ mio/mm	BKS
129	44	III	2	4	209	14,6	31,7	4,6	6/17
130	70	IV	2	3	2244	8,6	26,1	3,3	129/144
131	50	I c	6,5	14	255	14,6	33,2	4,4	15/26
132	43	I c	2	3	132	12,4	31,0	4,0	15/40
133	69	I a	2	3	221	14,6	29,8	4,9	3/8
134	41	III	2	3	492	11,6	30,5	3,8	31/67
135	68	I b	2	5	292	13,6	28,9	4,7	4/8
136	54	IV	2	5	149	13,3	27,7	4,8	37/60
137	51	IV	18	2	337	12,8	33,7	3,8	11/23
138	66	II a	2	4	448	14,8	37,0	4,0	24/53
139	75	IV	2	4	195	13,0	31,7	4,1	41/ 4
140	71	IV	4	14	2036	7,1	28,4	2,5	4/10
141	61	I a	2,6	4	206	13,4	36,1	3,6	19/45
142	48	IV	25	3	1189	11,1	26,4	4,2	66/95
143	58	IV	2	2	300	12,3	25,6	4,8	20/47
144	67	I c	2	18	250	14,2	30,9	4,6	8/27
145	59	IV	2	3,2	2372	11,7	32,5	3,6	53/87
146	61	III	2	11	413	14,3	34,1	4,2	19/46

Fortsetzung Tab. 7

Nr.	Alter	Stadium	CEA ng/ml	AFP ng/ml	Ferritin ng/ml	Hb g%	HbE pg	Ery ³ mio/mm	BKS
147	53	III	2	5	186	12,4	29,5	4,3	25/47
148	61	III	2	6	264	12,4	31,0	4,0	25/56
149	53	IV	2	8	3971	9,3	34,4	2,7	118/140
150	71	IV	2	8	345	12,2	27,7	4,4	35/51
151	71	I a	2	4	137	14,4	31,3	4,6	23/56
152	57	I a	2	5	124	13,4	29,8	4,5	9/26
153	52	I a	2	10	121	12,8	31,2	4,1	21/42
154	55	I a	2	4	254	14,9	29,8	5,0	6/23
155	48	IV	2	5	529	13,3	29,6	4,5	27/71
156	50	II b	61	5	214	14,0	34,2	4,1	7/21
157	52	IV	2,6	16	144	13,4	29,8	4,5	8/20
158	67	IV	2	3	587	13,4	27,4	4,9	18/38
159	69	IV	2	5	894	13,5	31,4	4,3	15/30
160	60	II a	2	5	310	11,4	39,3	2,9	9/31
161	50	IV	3,3	3	1030	6,0	25,0	2,4	75/119
162	68	IV	2	10	483	13,9	36,6	3,8	55/98
163	68	II b	3,1	8	187	10,3	31,2	3,3	21/53
164	34	IV	93	6	262	8,7	26,4	3,3	64/95

Tab. 8 a:

S A U L E N L I S T E

Art	Maße	Auftrag
<u>GELFILTRATION</u>		
Sepharose 6 B	2,5 x 90 cm	100 mg OES, 100 mg OEP
Sepharose G 200	2,5 x 80 cm	100 mg OES, Sammelfraktion 6B-OES 100 mg OEP, Sammelfraktion 6B-OEP Endreinigung d. J ¹²⁵ mark. CEA, OCAA-3
Sepharose G 100	1,5 x 85 cm	Sammelfraktion 6B-OEP AFP-haltige Fraktionen
	1,5 x 35 cm	Endreinigung des J ¹²⁵ -markiert. AFP, OCAA-4
Sepharose G 50	1,5 x 15 cm	Erstreinigung des J ¹²⁵ -markiert. AFP, CEA

ANIONENAUSTAUSCHERCHROMATOGRAPHIE

DEAE-Zellulose	2,5 x 80 cm	AS-Castor (OEPI), AS-Gundula (OEPI) AS-Balduin (OES G 200/I) u.a.
----------------	-------------	--

Tab. 8 b:

IMMUNABSORPTIONS-SÄULEN (CNBr. aktiv. Seph. 4 B)

Name/Nr.	Antigen/AS	Zeit	Masse
Gundula	OEP I	7/77	1,5 x 15 cm
Castor	OEP I	10/77	1,5 x 15 cm
Balduin	OES G200/I	8/77	1,5 x 15 cm
A-NE(Max)	NE 5/75NSa.	5/80	1,5 x 24,5 cm
Nr. 15	OEP III	8/78	1,5 x 13 cm
Nr. 18	CEA-MT Zaun.6BIIIIG200/Ia	8/78	1,5 x 13 cm
Nr. 27/28	NS	2/79	1,5 x 22,5 cm
Nr. 32	CEA-BC Neid.6BIII-18/3-27/1 NS/ABO/LEa	10/81	1,5 x 24 cm
Nr. 40	A-AT/AGP/A1b.(NCA?)	6/82	1,5 x 16 cm
C-NCA	kreuzreag.A-CEA-Ak	7/82	1,5 x 11 cm
Nr. 43	A-NCAspez.(NS/AB/CCEAa)	11/82	1,5 x 13 cm

Tab. 9: Auflistung der Antiseren von Kaninchen

Nr.	Name	Immun.Agens	Antigennachweis
1	Castor	OEP I gesamt	OCAA ₃
2	Pollux	OES I gesamt	OCAA ₃ , Ferritin
3	Gundula	OEP I gesamt	OCAA ₃
4	Klara	OES 6B/I	
5	Balduin	OES G 200/I	OCAA ₁
6	Emil	OES G 200/II	
7	Otto	OES G 200/III	
8	Felix	OES G 100/I	
9	Franzl	OES G 200/I	OCAA ₁
10	Robert	OES G 200/I	
11	Georg	OES G 200/I	
12	Nr. 5	OES G 200/III	
13	Werner	OEP II gesamt	
14	Nr. 9	OEP II/6B II	OCAA ₂ (CEA)
15	Nr. 10	OEP II/6B II	OCAA ₃ , OCAA ₂
16	Nr. 15	OEP III gesamt	OCAA ₄
17	Nr. 31	OCAA ₃ (OEP IV/6BI) Cn-Br-NE/27 AHS/1	
18	Nr. 35	OEP III Cn-Br 15/3	OCAA ₄
19	Nr. 34	Mor 6B/IV-C18/1-NE/3	OCAA ₄
20	Nr. 18	Zaun 6B/III-G 200/Ia (Mamma-Ca-CEA)	
21	Nr. 27/28	Humanserum	
22	Nr. 33	normales Leberferritin	
23	Nr. 383	Ovarialkarzinom-CEA (Burtin)	OCAA ₂
24	Nr. 493	Ovarialkarzinom-CEA (Referenz-Antiserum von Prof.Burtin,Villejuif	OCAA ₂
25	Xaver	Referenz-Anti-CEA-CO-IgG	

Tab. 10: Parameter der Standard-Inhibitionskurven (Logit-Log-Geraden)
in Abhängigkeit von verschiedenen Tracern, Antiseren und Standards

Tracer	Antiserum- Konzentration	Stand. + NHS Inhib.	unspez. Bindung ($\bar{x} \pm s$)	Bindungs- Aktivität ($\bar{x} \pm s$)	50% Punkt ng/ml ($\bar{x} \pm s$)	$Y = A + B \cdot X$ $\frac{A}{(\bar{x} \pm s)} \quad \frac{B}{(\bar{x} \pm s)}$	Exp. Nr.
CEA-CO 4/75- 7/80 (N=33)	A-CEA-CO (X_{av}) 1/80,00 - 1/120,000	CEA-CO	3.8+1.2 N = 230	31.5+4.9 N = 230	36.8+10 N = 230	3.57+0.37 -2.27+0.23 N = 238 N = 238	
CEA-CO 3/80	A-CEA-CO (X_{av}) 1/140,000	CEA-CO CEA-OV	5.4 5.4	34.6 34.6	26.7 27.1	2.99 -2.10 2.98 -2.08	1 2
	A-CEA-OV (495) 1/10,000	CEA-CO CEA-OV	5.4 5.4	31.5 31.5	20.6 18.1	2.65 -2.02 2.52 -2.01	3 4
CEA-OV 3/80	A-CEA-CO (X_{av}) 1/50,000	CEA-CO CEA-OV	6.1 6.1	34.8 34.8	25.3 25.8	4.23 -3.01 4.15 -2.96	5 6
	A-CEA-OV (495) 1/3,000	CEA-CO CEA-OV	6.1 6.1	30.4 30.4	20.7 19.3	3.72 -2.83 3.76 -2.92	7 8

Tab. 11: Signifikanz-Tabelle der B-Wert-Differenzen (Steigungen) der Standard-Inhibitions-Regressionsgeraden (Logit-Log-Geraden)

Tacer	Exp. Nr.	1 ⁺	3	5 ⁺	7
CEA-CO	1	/	1	6	6
3/80	2	ns	ns	6	6
	3	1	/	6	6
	4	ns	ns	6	6
CEA-OV	5	6	6	/	4
3/80	6	6	6	ns	ns
	7	6	6	4	/
	8	6	6	4	ns

Signifikanz: ns-nicht signif.; 1: $p \leq 0.05$, 2: $p \leq 0.02$,
 3: $p \leq 0.025$, 4: $p \leq 0.01$, 5: $p \leq 0.005$,
 6: $p \leq 0.001$

1⁺, 5⁺: A-CEA-CO (Xaver) + Standard CEA-CO;

3,7: Stand.CEA-CO

Tab. 12: Pipettier-Schema des OCAA-3^{*}-Radioimmunoassay (Mikroliter)

Substanz	T	N	O	Stand.	Probe
P.+Tween 20/3% +Pferde-S.15%	-	200	200	200	200
Puffer	-	200	100	-	-
Standard	-	-	-	100	-
Probe	-	-	-	-	100
1.Ak	-	-	100	100	100
OCAA-3 [*] Tr.	100	100	100	100	100
1. Inkubation, R.T., 16-24 h					
2.Ak	-	100	100	100	100
2. Inkubation, R.T., 16-24 h					
Zentrifugation, R.T., 1000g, 45'					

Tab. 13: Zusammenstellung der stat. Kenngrößen von Alter, BKS (1 Std.), Hb, Hb_E u. Erythrozytenzahl bei Pat. mit Ovarialkarzinom

FIGO-Stadium	I	II	III	IV
Alter N	54	26	17	67
$\bar{x}$	58,9	59,8	57,2	59,8
s	11,7	10,1	11,8	11,4
V.K.%	19,9	17,0	20,6	19,0
BKS N	49	21	14	62
10.Perz.	2,2	10,2	4,7	8,9
MODUS	6,9	27,1	7,5	26,0
MEDIAN	12,1	27,0	35,0	30,0
$\bar{x}$	17,3	35,0	46,4	42,9
90.Perz.	37,8	59,8	96,0	98,0
Hb N	54	26	17	67
$\bar{x}$	13,8	12,7	12,6	12,0
s	1,3	1,4	1,8	2,1
V.K.%	9,5	11,4	14,2	17,1
Hb _E $\bar{x}$	30,5	31,7	31,0	30,1
s	2,2	4,3	2,9	3,3
V.K.%	7,1	13,6	9,3	11,1
Ery(Mio) $\bar{x}$	4,5	4,1	4,1	4,0
s	0,5	0,6	0,6	0,6
V.K.%	10,6	14,9	13,6	16,1

Tab. 14: Serum-AFP-Spiegel ($\mu\text{g/ml}$) bei Pat. mit Ovarialkarzinom (N = 164)

FIGO-Stadium	I	II	III	IV
N	54	26	17	67
10. Perz.	0,8	1,9	1,0	0,8
MODUS	4,6	4,8	4,5	4,9
MEDIAN	3,7	4,8	4,2	4,0
$\bar{x}$	7,0	10,7	5,8	5,6
90. Perz.	10,1	8,7	11,0	8,8

Tab. 15: Serum-CEA-Spiegel ($\mu\text{g/ml}$) bei Pat. mit Ovarialkarzinom (N = 164)

FIGO-Stadium	I	II	III	IV
N	54	26	17	67
10. Perz.	0,3	0,4	0,4	0,4
MODUS	1,6	1,7	1,6	1,8
MEDIAN	1,7	2,0	1,7	2,1
$\bar{x}$	1,5	5,5	2,6	15,4
90. Perz.	3,0	5,6	3,9	5,5

Tab. 16: Serum-Ferritin-Spiegel ($\mu\text{g/ml}$) bei Pat. mit Ovarialkarzinom (N = 162)

FIGO-Stadium	I	II	III	IV
N	53	25	17	67
10. Perz.	51,0	56,8	70,8	139,6
MODUS	203,6	196,4	400,0	412,5
MEDIAN	201,7	296,9	354,2	456,7
$\bar{x}$	232,5	394,0	430,1	683,9
90. Perz.	452,1	937,5	912,5	1691,7
Signifikanz (U-Test)	I	p < 0,05	p < 0,01	p < 0,001
	II		NS	p < 0,05
	III			NS

Tab. 17: Klinische Korrelationskoeffizienten und Signifikanzen von prätherapeutischen Serumparametern bei Pat. mit Ovarialkarzinom (N = 161)

Beziehung	r	Signifikanz
Hb/Ery	0,761	$p < 0,001$
Ferr./BKS	0,450	$p \ll 0,001$
Ferr./Hb	-0,431	$p < 0,001$
Ferr./Ery	-0,438	$p < 0,001$
BKS/Hb	-0,578	$p < 0,001$
BKS/Ery	-0,480	$p < 0,001$

Abb. 1: Therapie des Ovarialkarzinoms

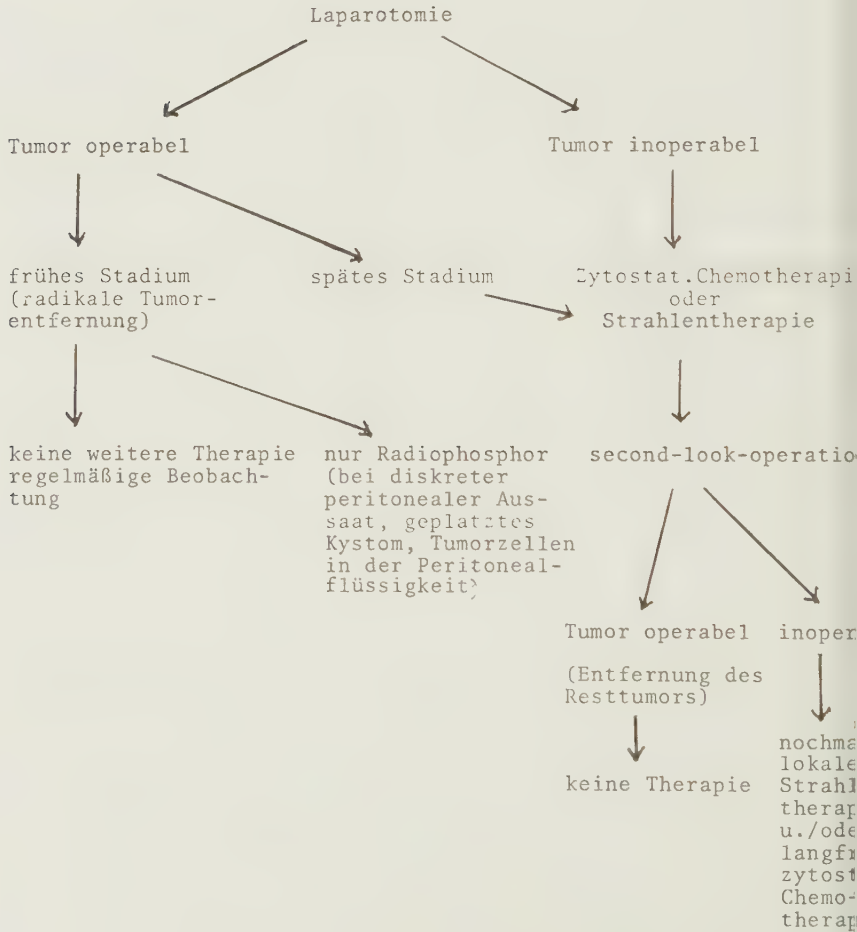


Abb. 2 a:

A. TUMOREXTRAKTPRÄPARATION

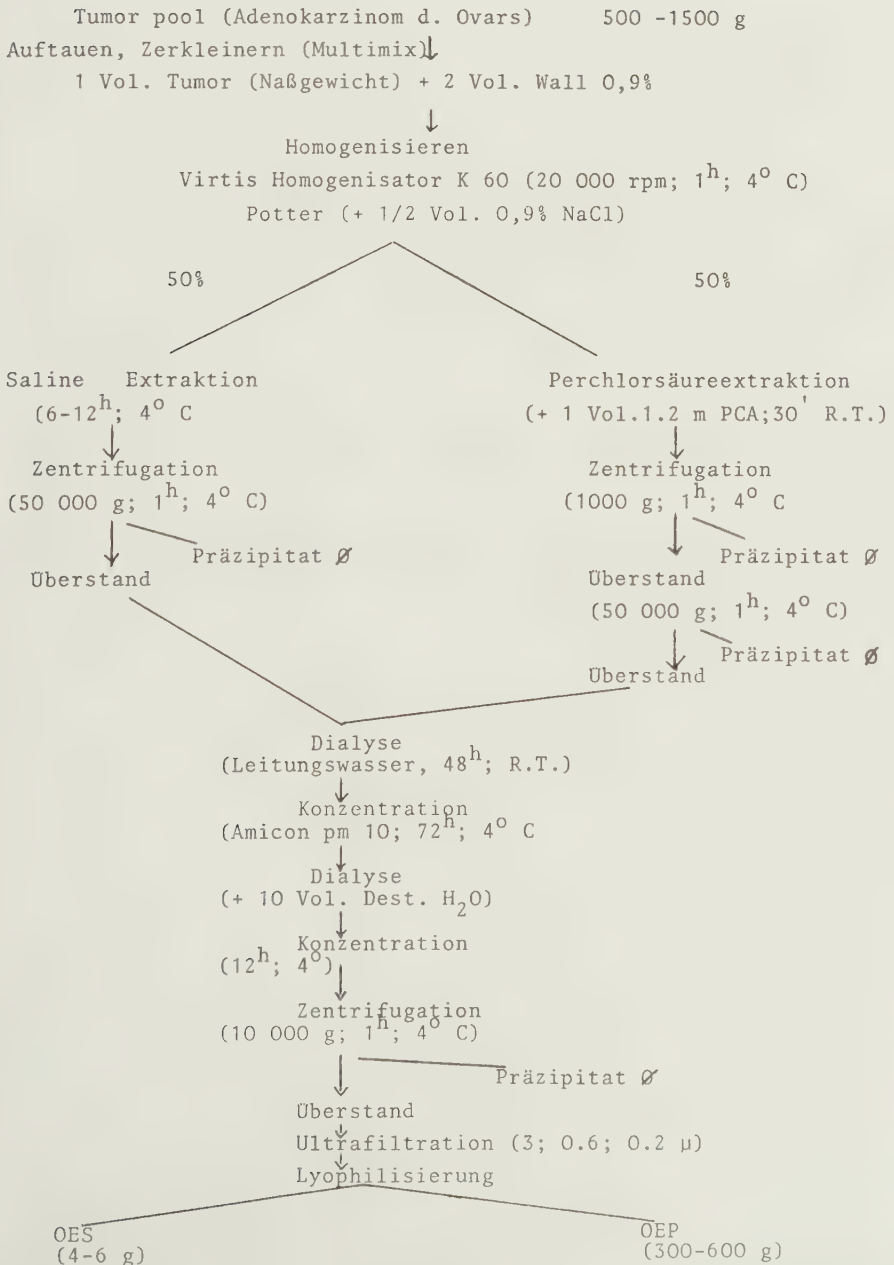


Abb. 2 b:

B. SAULEN-CHROMATOGRAPHIE

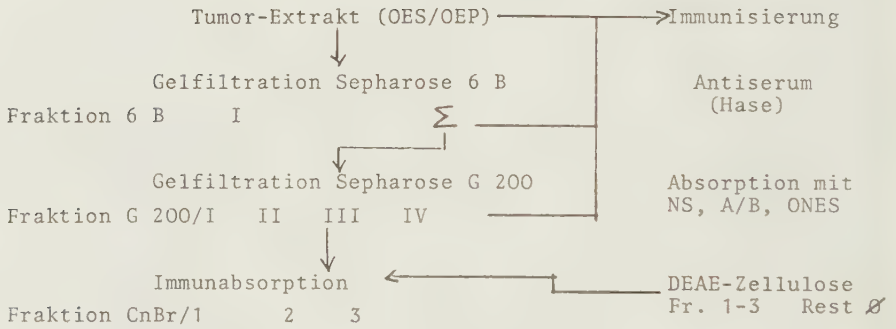


Abb. 3:

CAF-ELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON
OVARIALKARZINOM-EXTRAKT

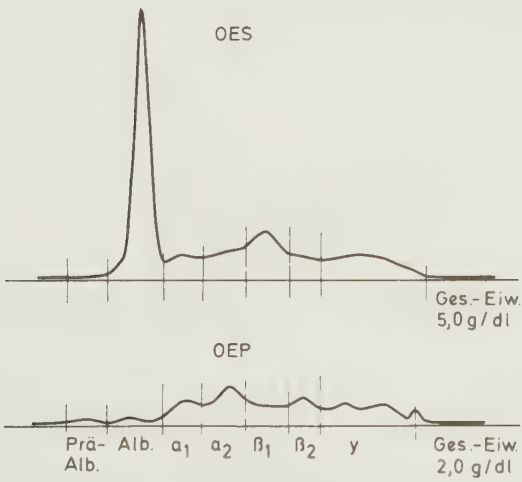


Abb. 4a: Elutionsprofil der Gelfiltration von OES I
mit Sepharose 6 B
und auf
Sephadex G 200

GELFILTRATION VON OVARIALKARZINOM-EXTRAKT (SALIN) OES I

Sepharose 6 B-Säule (2,5 x 80 cm)

Auftrag 150 mg OES I

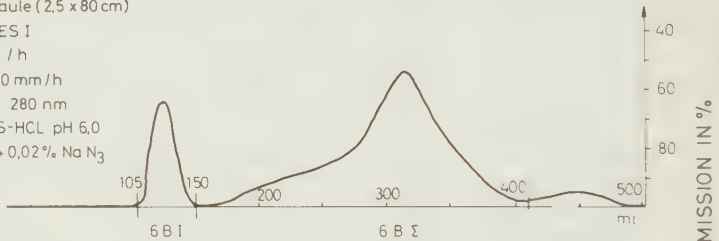
6 ml-Frakt / 39 ml / h

Papiervorschub 20 mm / h

Transmission bei 280 nm

Puffer 0,05 m TRIS-HCL pH 6,0

0,1 n NaCl + 0,02 % Na₂S₂O₃



Sephadex G 200-Säule (2,5 x 80 cm)

Auftrag OES I / 6 B Σ

6 ml - Frakt / 30 ml / h

Papiervorschub 10 mm / h

Transmission bei 254 nm

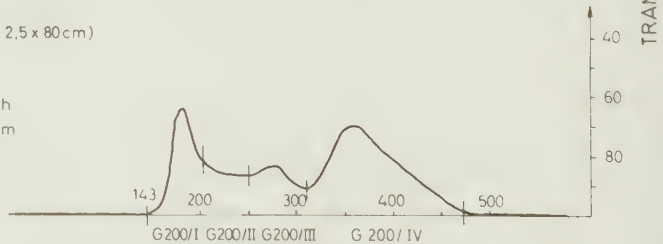


Abb. 4 b: Elutionsprofil der Gelfiltration von OEP II mit Sepharose G B und OEP I mit Sephadex G 200

GELFILTRATION VON OVARIALKARZINOM-EXTRAKT (PCA) OEP II

Sepharose 6 B-Säule (2,5 x 80 cm)

Auftrag 100 mg OEP II

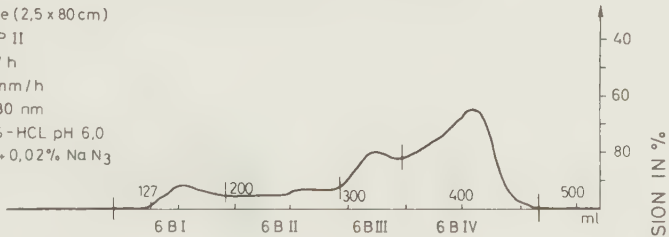
6 ml - Frakt / 42 ml / h

Papiervorschub 20 mm / h

Transmission bei 280 nm

Puffer: 0,05 m TRIS-HCL pH 6,0

0,1 n NaCl + 0,02% NaN₃



GELFILTRATION VON OVARIALKARZINOM-EXTRAKT (PCA) OEP I

Sephadex G200-Säule (2,5 x 80 cm)

Auftrag 100 mg OEP I

6 ml - Frakt / 18 ml / h

Papiervorschub 10 mm / h

Transmission bei 254 nm

Puffer: 0,05 m TRIS-HCL pH 6,0

0,1 n NaCl + 0,02% NaN₃

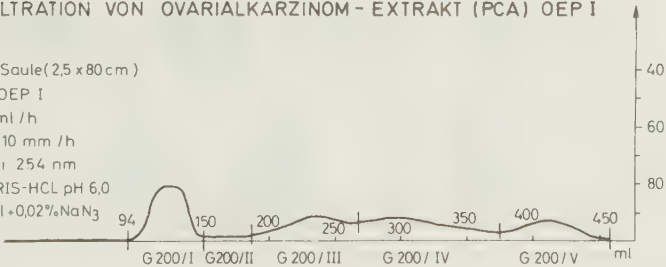


Abb. 5 a: Immunodiffusionsuntersuchung nach Ouchterlony des salinen Ovarialkarzinom-Extrakts OES im Vergleich mit normalem Ovarialgewebsextrakt ONE im Ansatz gegen Referenz-Antiseren gegen Ferritin und Lactoferrin sowie Antiserum Nr. 2 (Pollux DIII und Nr. 9 (Franzl)

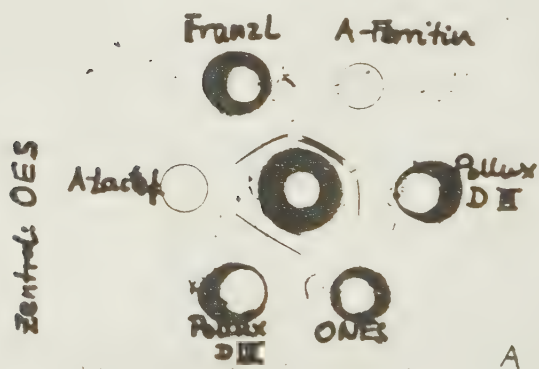


Abb. 5 b: Immunodiffusionsuntersuchung von verschiedenen Gelfiltrationsfraktionen von salinem Ovarialkarzinom-Extrakt OES im Ansatz gegen Antiserum Nr. 2 (Pollux DIII, DEAE-Zellulose-Fraktion, zentral)

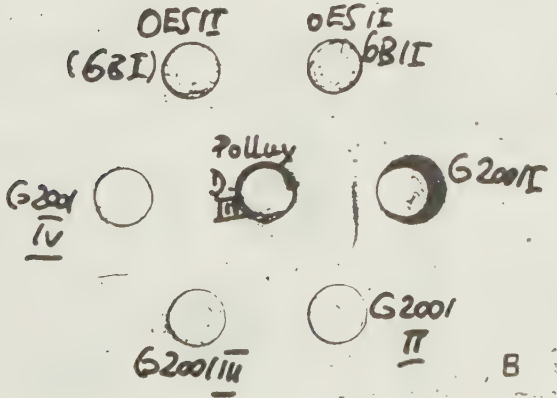


Abb. 5 c: Immunodiffusionsuntersuchung von Ovarialkarzinom-extrakt OES und OEP sowie deren Gelfiltrations-fractionen G 200/I und von normalem Ovarialgewebs-extrakt ONES im Ansatz gegen ein mit ONES zusätzlich absorbiertes Antiserum Nr. 5 (Balduin) und gegen Antiserum Nr. 3 (Gundula)

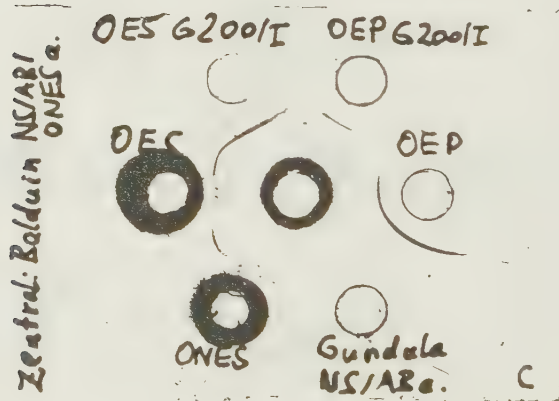


Abb. 5 d: Immunodiffusionsuntersuchung von gelfiltriertem Ovarialkarzinom-Perchlorsäureextrakt OEP II u. v. OEP III sowie von normalem Lungengewebs-Perchlorsäureextrakt LE und einer CEA-angereicherten Gelfiltrationsfraktion (Karg. 6BIII/G200/I) im Ansatz gegen ein spezifisches (A-CEA TOM) u. noch mit NCA kreuzreagierendes (A.CEA LKB) Referenz-Anti-Serum sowie im Vergleich zu einem Antiserum gegen normalen Colonschleimhaut-Perchlorsäureextrakt (A-NE Max)

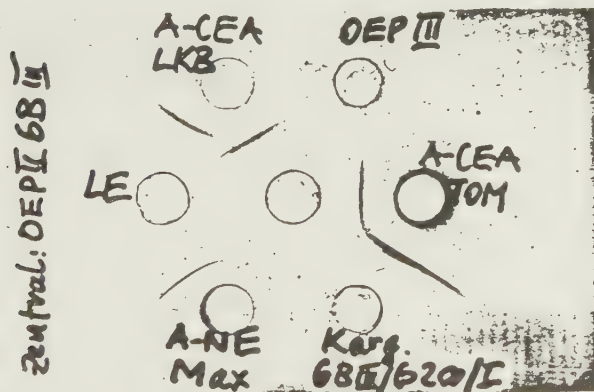


Abb. 5 e: Immunodiffusionsuntersuchung von verschiedenen Gelfiltrationsfraktionen von Ovarialkarzinom-Perchlorsäureextrakt OEP II im Ansatz gegen ein Referenz-Anti-CEA-Serum (TOM)

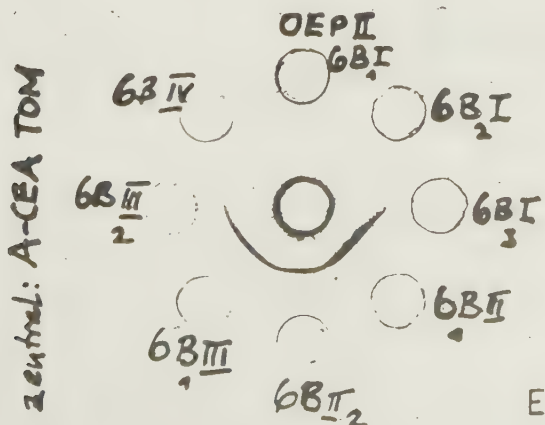


Abb. 6: Immundiffusionsuntersuchung einer CEA-spezifischen immunabsorbierten (CLE/1-CCEA/3) und einer Antikörperfraktion mit CEA/NCA kreuzreagierenden Antikörpern (CLE/3) von Antiserum Nr. 15 ("10") im Vergleich mit einem spezifischen Referenz-Anti-CEA-Serum (Nr. 32 CEA) im Ansatz gegen normalen Lungengewebeextrakt (NCA-haltig) sowie gegen eine CEA- und eine NCA/CEA-haltige positive Kontrolle

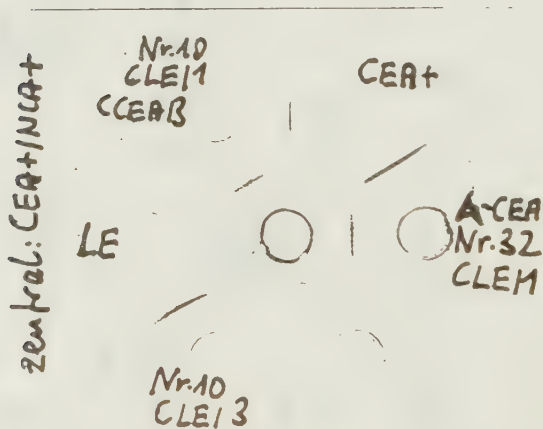


Abb. 7: Affinitäts-Chromatographie von CEA-haltigem gelfiltrierten Ascites-Perchlorsäureextrakt (Pat.Hoffm., Ovarial-Ca.) an CNBr-aktiv. Sepharose 4B mit angekoppeltem Anti-CEA-IgG vom Kaninchen (Nr. 18). PBS-phosphatgepufferte Kochsalzlösung

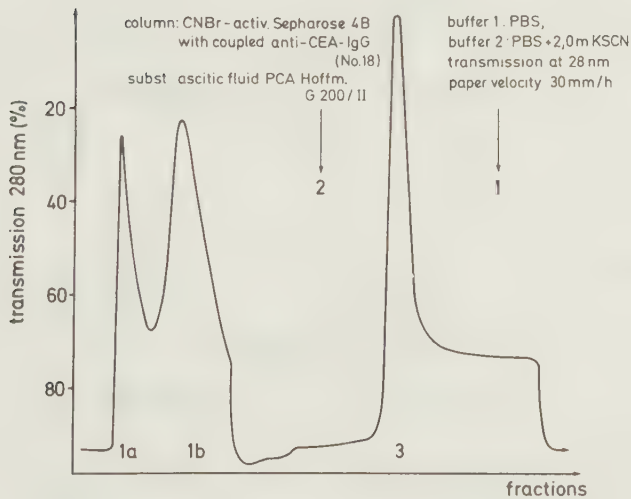


Abb. 8a, b, c: Immunodiffusionsuntersuchung von verschiedenen hochgereinigten CEA-Präparationen (CEA-CO=Colonkarzinom-CEA; CEA-OV=Ovarialkarzinom-CEA; CEA-PA=Pankreaskarzinom-CEA; CEA-B=Bronchialkarzinom-CEA; CEA-MT=Mammakarzinom-CEA) im Ansatz gegen die entsprechenden homologen Anti-CEA-Seren (A-CEA-CO, A-CEA-OV, A-CEA-PA, A-CEA-BC, A-CEA-MT)

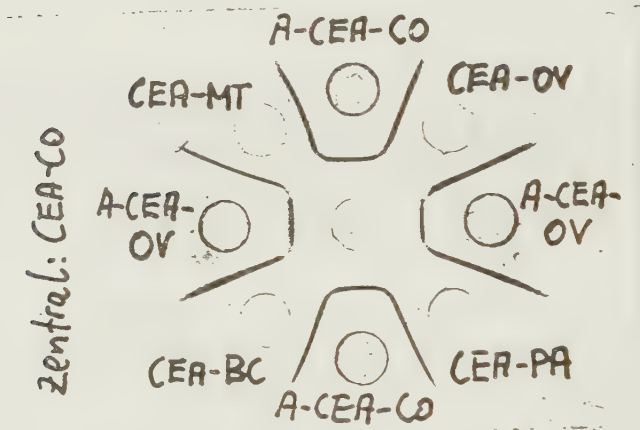


Abb. 8 a:

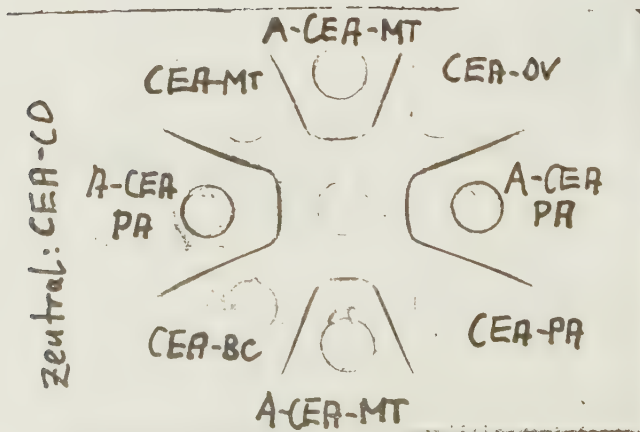


Abb. 8 b:

Abb. 8 c:

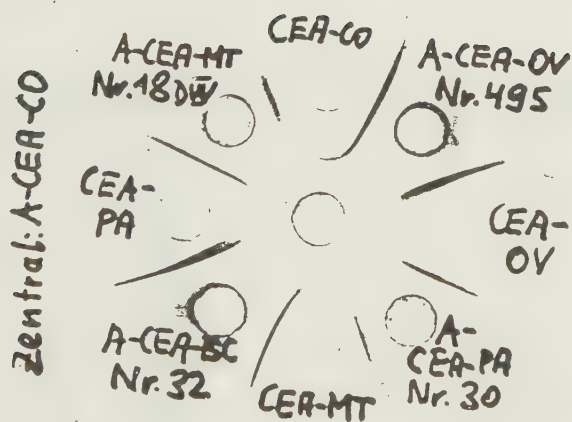


Abb. 9: J-125-Markierung von Ovarialkarzinom-CEA-OV und Gelfiltration des Markierungsgemisches an Sephadex G 50 fine (links) und Sephadex G 200 (rechts).
cpm = Impulszahlrate (Counts/Minute)

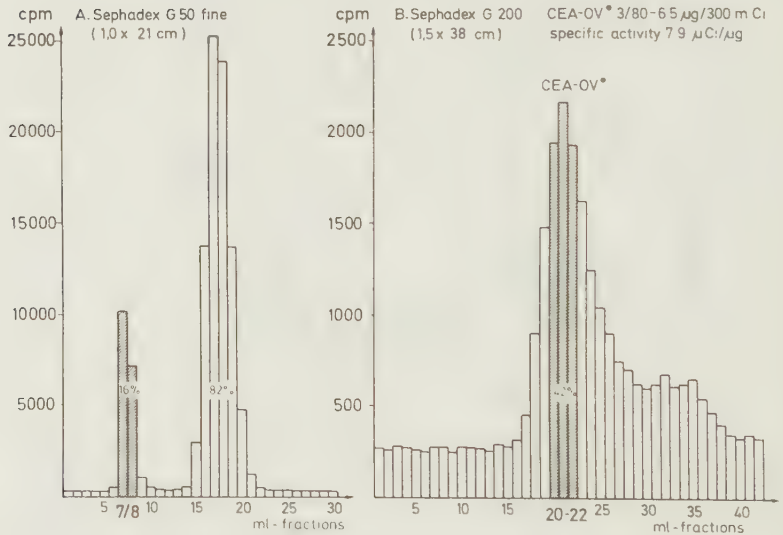


Abb. 10: Antikörper-Verdünnungskurven eines Referenz-Anti-Colonkarzinom-CEA-Serums (Xaver IgG) und von zwei Anti-Ovarialkarzinom-CEA-Antiseren (Nr. 383, 495)* im Ansatz gegen Ovarialkarzinom-CEA-Tracer CEA-OV und Referenz-Colonkarzinom-CEA-Tracer CEA-CO

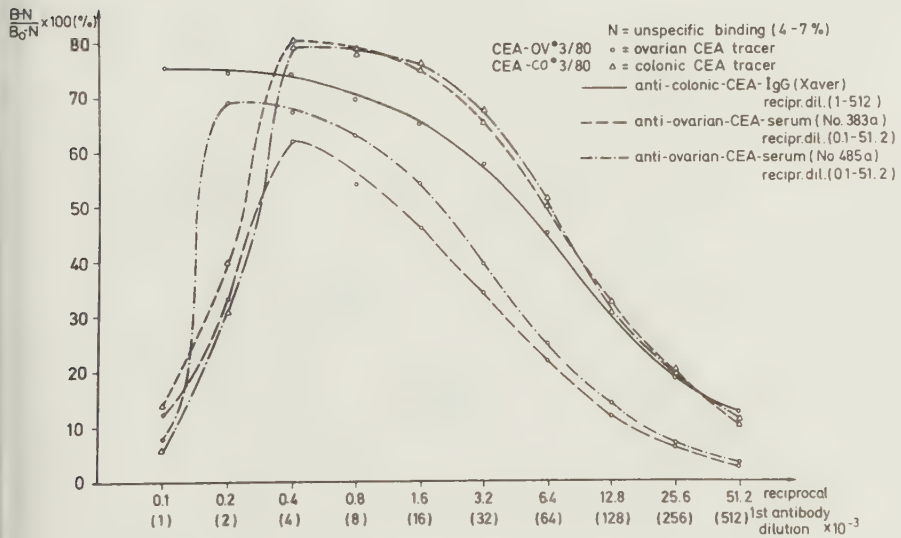


Abb. 11: Standard-Inhibitionskurven bzw. Logit-Log-Geraden des Referenz-Tracers CEA-CO im Ansatz mit Referenz-Anti-CEA-CO-IgG (Xaver, oben) und Anti-Ovarialkarzinom-CEA-OV-Serum (Nr. 495, unten) bei Inhibition mit zwei CEA-Standards (CEA-CO, CEA-OV)

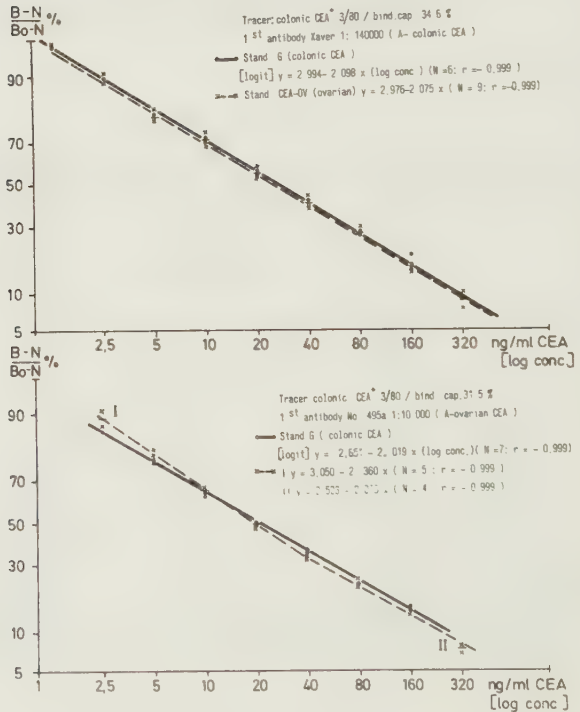


Abb. 12: Standard-Inhibitionskurven bzw. Logit-Log-Geraden des Ovarialkarzinom-CEA-OV-Tracers im Ansatz mit Referenz-Anti-CEA-CO-IgG (Xaver, oben) und Anti-Ovarialkarzinom-CEA-OV-Serum (Nr. 495, unten) bei Inhibition durch zwei verschiedene CEA-Standards (CEA-CO, CEA-OV)

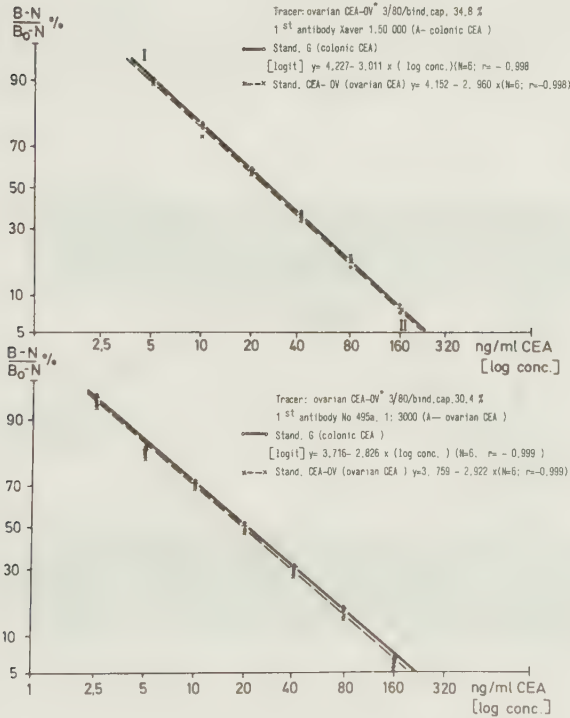


Abb. 13: Immunodiffusionsuntersuchung von Ovarialkarzinom-Extrakt OES und OEP und deren Gelfiltrationsfraktionen G 200/I im Ansatz gegen Antiserum Nr. 3 (Anti-OEP, Gundula, zentral) und Nr. 5 (Balduin)

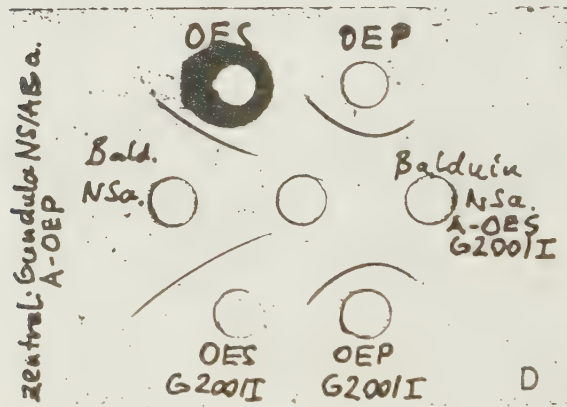


Abb. 14: Immunelektrophoretische Untersuchung der Gelfiltrationsfraktion G 200/I von Ovarialkarzinom-Perchlorsäureextrakt OEP I (zentrales Antigenreservoir) im Ansatz gegen Antiserum Nr. 3 (Gundula DIV) sowie gegen an normalem Lungengewebeextrakt absorbiertes Antiserum Nr. 17 ("31") (äussere Antikörper-Rillen)

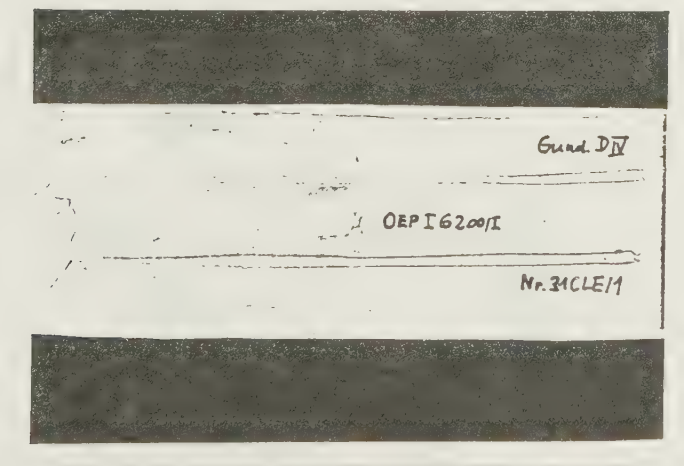


Abb. 15: Immunodiffusionsuntersuchung von Ovarialkarzinom-Perchlorsäureextrakt OEP I und OEP III im Vergleich zum normalen Lungengewebeextrakt LE im Ansatz gegen Antiseren gegen normalen Colonschleimhautextrakt (A-NE,Max), gegen OEP III (Nr. 15), gegen OEP I (Gund.DIV) und gegen OEP II 6B II (Nr. 10)

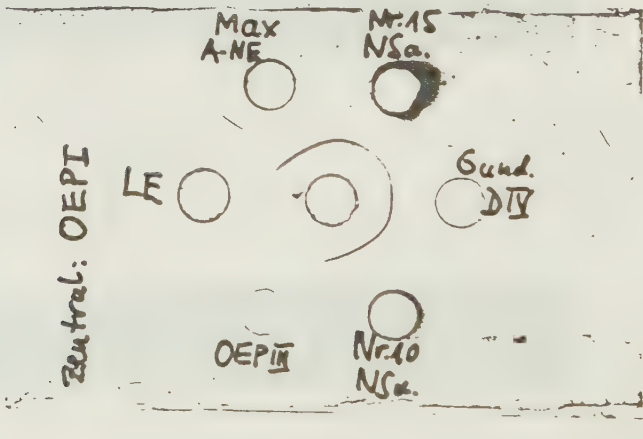


Abb. 16: Immunodiffusionsuntersuchung von Ovarialkarzinom-Perchlorsäureextrakt OEP IV (zentral) und gelfiltriertem OEP I G 200/I im Ansatz gegen ein Referenz-Antiferri-tin-Serum, zwei Referenz-Anti-CEA-Seren (LKB, Nr. 20), gegen Antiserum Nr. 3 (Gundula, Anti-OEP I) und gegen ein Antiserum gegen normalem Colonschleimhautextrakt (A-NE DIVa)

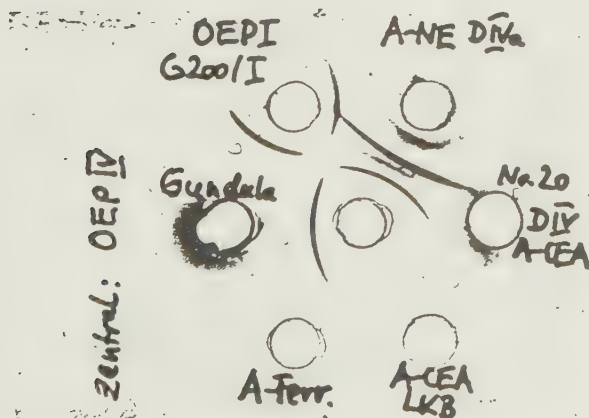


Abb. 17: Immunodiffusionsuntersuchung von Antiserum Nr. 17 ("31", absorbiert mit Normalserum NS und A/B-Erythrozyten bzw. zusätzlich mit Lungengewebeextrakt LE) im Vergleich mit Anti-OEP III-Serum (Nr. 15) und im Ansatz gegen OEP IV, OEP I G 200/I, gegen normalen Lungengewebs-(LE) und Colonschleimhautextrakt (NE)

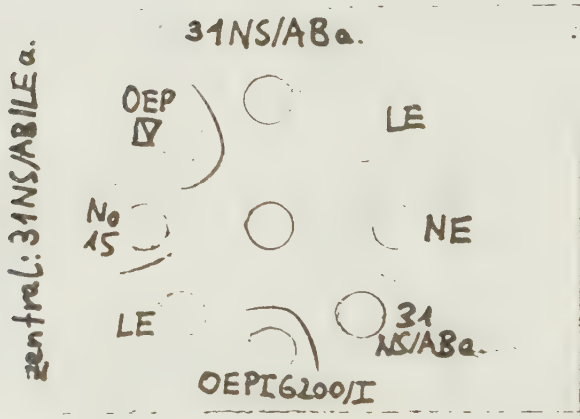


Abb. 16: Immunodiffusionsuntersuchung von Ovarialkarzinom-Perchlorsäureextrakt OEP IV (zentral) und gelfiltriertem OEP I G 200/I im Ansatz gegen ein Referenz-Antiferri-tin-Serum, zwei Referenz-Anti-CEA-Seren (LKB, Nr. 20), gegen Antiserum Nr. 3 (Gundula, Anti-OEP I) und gegen ein Antiserum gegen normalem Colonschleimhautextrakt (A-NE DIVa)

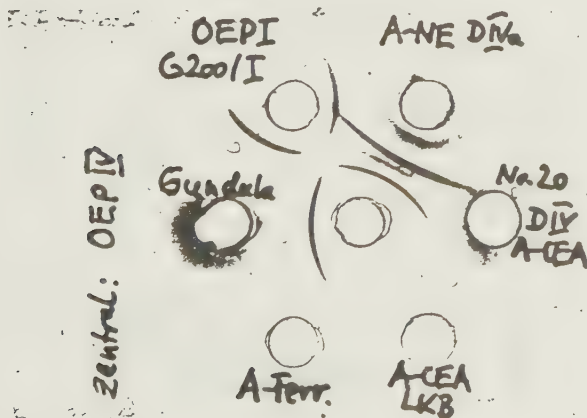


Abb. 17: Immunodiffusionsuntersuchung von Antiserum Nr. 17 ("31", absorbiert mit Normalserum NS und A/B-Erythrozyten bzw. zusätzlich mit Lungengewebeextrakt LE) im Vergleich mit Anti-OEP III-Serum (Nr. 15) und im Ansatz gegen OEP IV, OEP I G 200/I, gegen normalen Lungengewebs-(LE) und Colonschleimhautextrakt (NE)

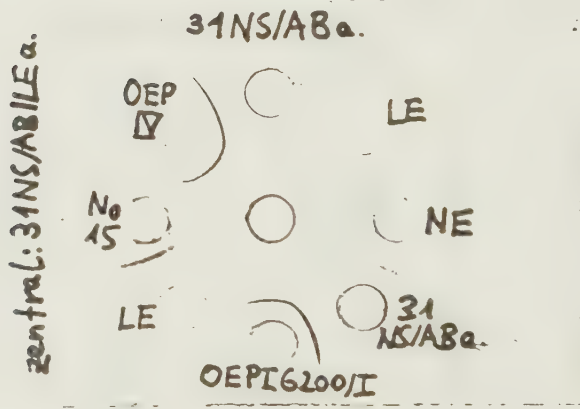


Abb. 18: Immunodiffusionsuntersuchung von gelfiltriertem Ovarialkarzinom-Perchlorsäureextrakt OEP I G 200/I im Ansatz gegen unterschiedlich mit LE (normaler Lungengewebs-extrakt) absorbiertem Antiserum Nr. 17 ("31"), Antiserum Nr. 1 (Castor), Nr. 2 (Pollux) und Antiserum Nr. 3 (Gundula DIV)

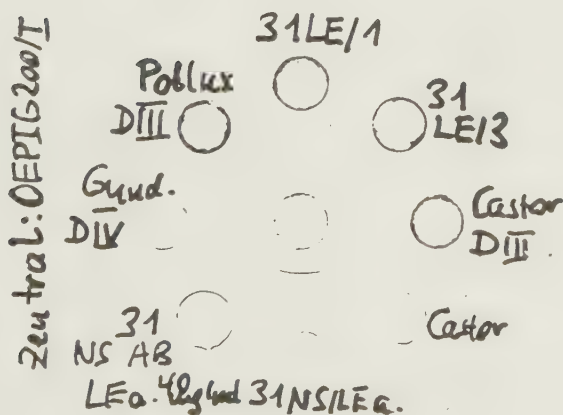


Abb. 19: Affinitäts-Chromatographie (Immunabsorption) von Antiserum Nr. 15 ("31") nach Vorabsorption mit Normalserum und A/B-Erythrozyturie an einer CNBr.-aktivierten Sepharose 4B-Säule mit angekoppeltem normalen Lungengewebsextrakt LE

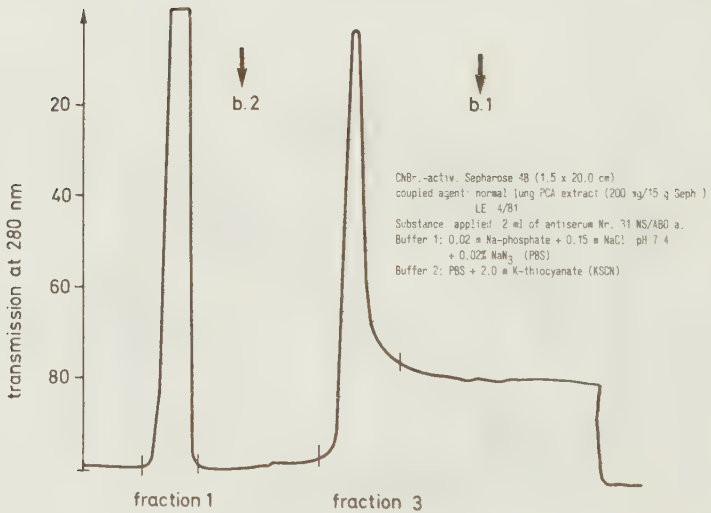


Abb. 18: Immunodiffusionsuntersuchung von gelfiltriertem Ovarialkarzinom-Perchlorsäureextrakt OEP I G 200/I im Ansatz gegen unterschiedlich mit LE (normaler Lungengewebs-extrakt) absorbiertem Antiserum Nr. 17 ("31"), Antiserum Nr. 1 (Castor), Nr. 2 (Pollux) und Antiserum Nr. 3 (Gundula DIV)

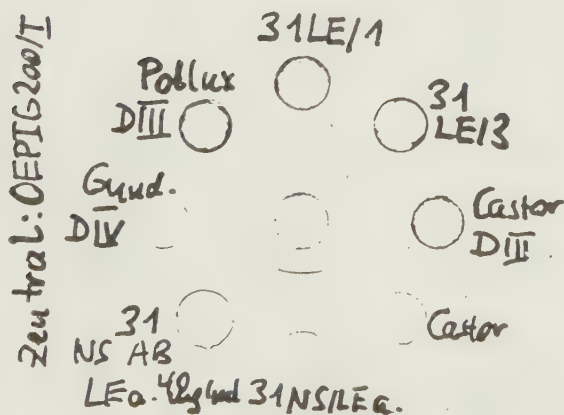


Abb. 19: Affinitäts-Chromatographie (Immunabsorption) von Antiserum Nr. 15 ("31") nach Vorabsorption mit Normalserum und A/B-Erythrozyturie an einer CNBr.-aktivierten Sepharose 4B-Säule mit angekoppeltem normalen Lungengewebsextrakt LE

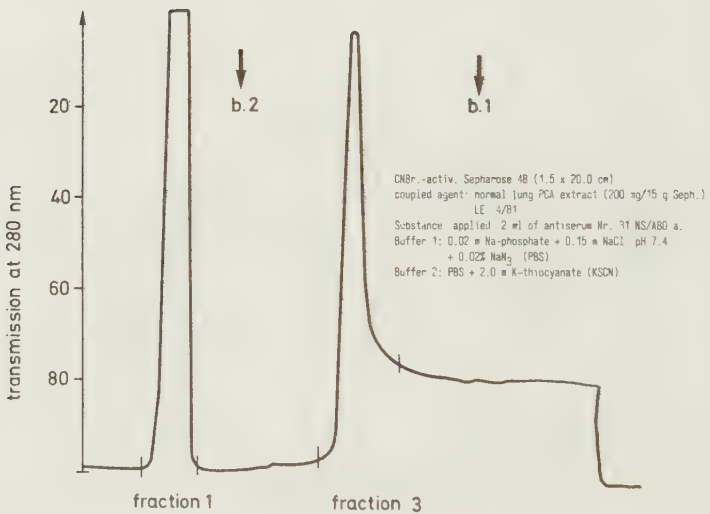


Abb. 20: Immunodiffusionsuntersuchung von hochgereinigtem OCAA-3 (OEP IV 6BI-NE/3-C27/1, Präparation 7a/79) im Ansatz gegen Antiserum A-NE DIV, Antiserum Nr. 1 (Castor), ein Anti-Humanserumprotein-Serum (AHS), ein Referenz-Anti-CEA-Serum (LKB) und ein Anti-alpha-Chymotrypsin-Serum sowie im Vergleich mit Ovarialkarzinom-Gesamtextrakt OEP IV

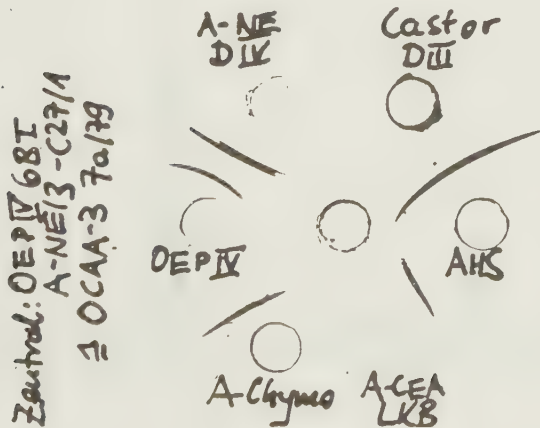


Abb. 21: J-125-Markierung von OCAA-3 und Gelfiltration des Markierungsgemisches an Sephadex G 50 fine (links) und Sephadex G 200 (rechts). Cpm-Impulszählrate (Counts/Minute)

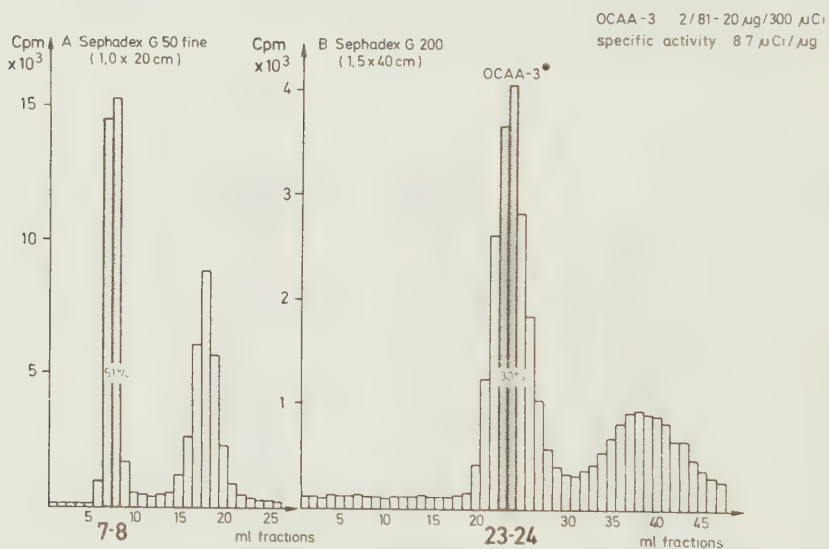


Abb. 22: Antikörper-Verdünnungskurven von Antiserum Nr. 3 (Gundula DIV) und Nr. 17 ("31") mit OCAA-3-Tracer

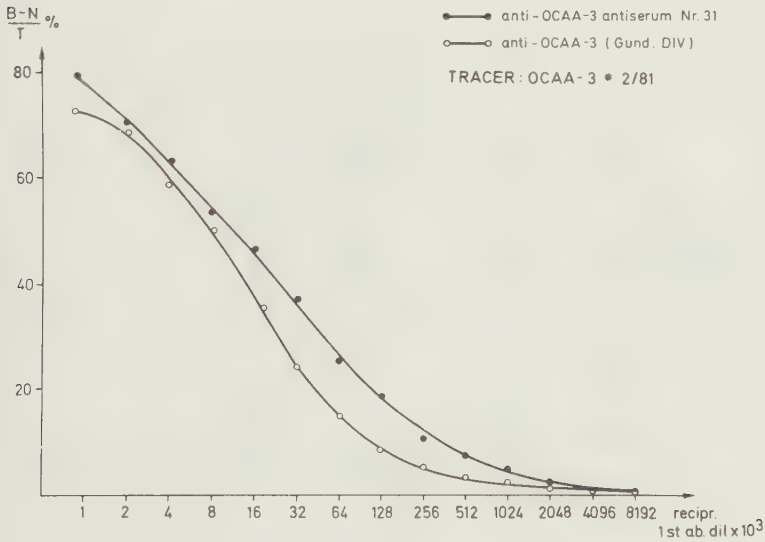


Abb. 23: Standard-Inhibitionskurve von Tracer OVAA-3* mit Antiserum Nr. 17 ("31") und Inhibition durch einen OCAA-3-Standard (2/80). (Logit-Log-Gerade).

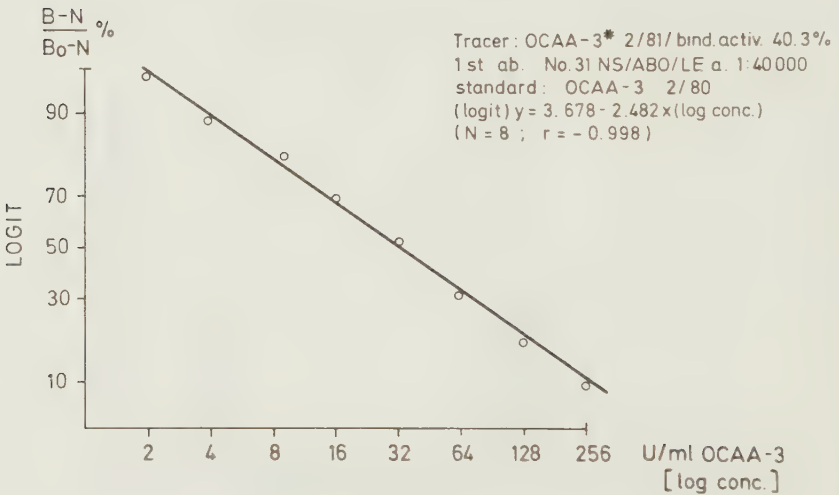


Abb. 24: Immunodiffusionsuntersuchung von hochgereinigtem OCAA-3 (OEP IV 6BII-NE/3-C27/1) im Vergleich zur NE/1-Fraktion und zur 6BIV-NE/3-Fraktion sowie im Ansatz gegen Anti-NE-Serum (D III) und Antiserum Nr. 1 (Castor) sowie Referenz-Antiseren gegen normale Serumproteine (AHS) und gegen α_1 -Chymotrypsin.

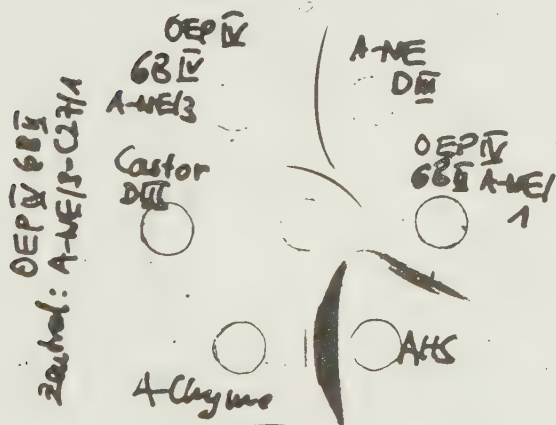


Abb. 25: Hochauflösende Gelpermeations-Chromatographie von OCAA-4 (OEP IV-6bIV-Ne/3-27/1-15/1) an einer LKB Ultro Pak TSK G 4000 SW-Säule

LKB ULTRO PAK TSK G 4000 SW (7.5x600 mm)
Substance: OEP IV 6 B IV- NE/3-27/1-15/1 $\approx 600 \mu\text{g}$
eluant : 0.05mNa phosphate pH 7.5
flow rate 6ml/h , fraction vol. 330 μl ; paper speed 6 cm/h

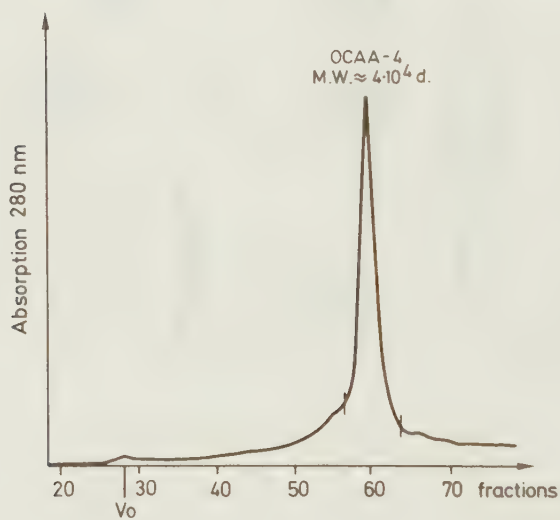


Abb. 26: Immunodiffusionsuntersuchung von Ovarialkarzinom-Perchlorsäureextrakt OEP III im Vergleich zu einer an normalen Colonschleimhautextrakt NE adsorbierten Fraktion von Ascites-Perchlorsäureextrakt (Colon-Ca) und im Ansatz gegen Anti-NE-Serum (DIII), Anti-OEP III-Serum (Nr. 15 DIV) sowie die Antiseren Nr. 18 ("35") und Nr. 19 ("34")

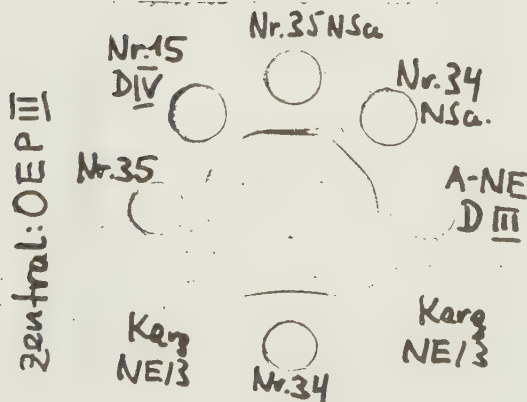


Abb. 27: J-125-Markierung von OCAA-4 und Gelfiltration des Markierungsgemisches an Sephadex G 50 fine (links) und Sephadex G 100 (rechts). cpm = Impulszählrate (Counts/Minute)

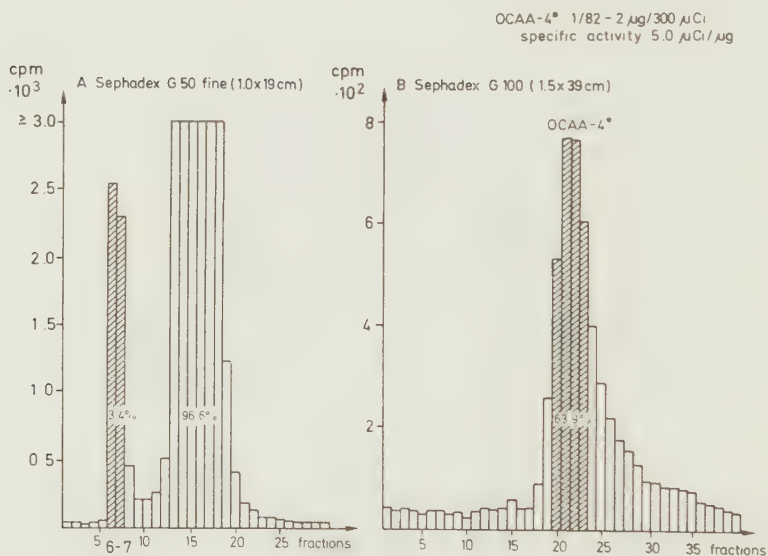


Abb. 28: Antikörper-Verdünnungskurven von Antiserum Nr. 19 ("34") und Nr. 18 ("35") nach Absorption an einer LE-Immunabsorptionssäule mit einem OCAA-4-Tracer

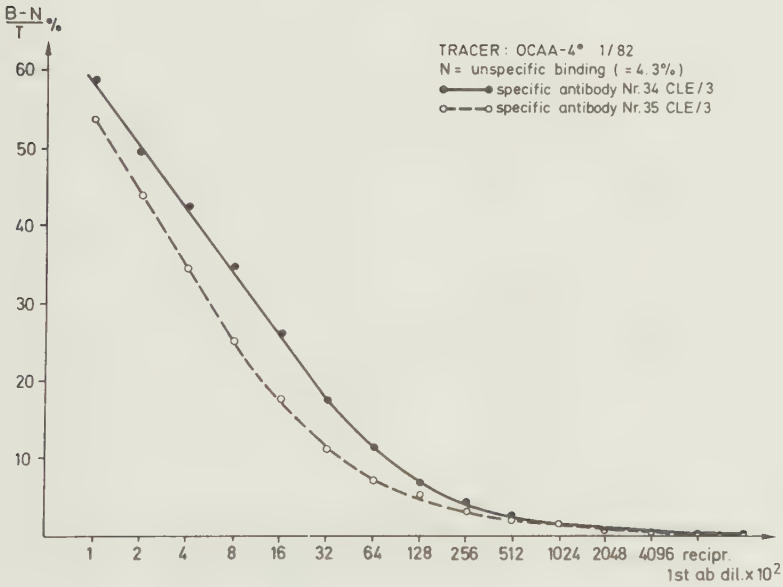


Abb. 29: Standard-Inhibitionskurve (Logit-Log-Gerade) von Tracer OCAA-4 mit Antiserum Nr. 19 ("34", LE-absorbiert) und unter Inhibition durch den OCAA-4-Standard

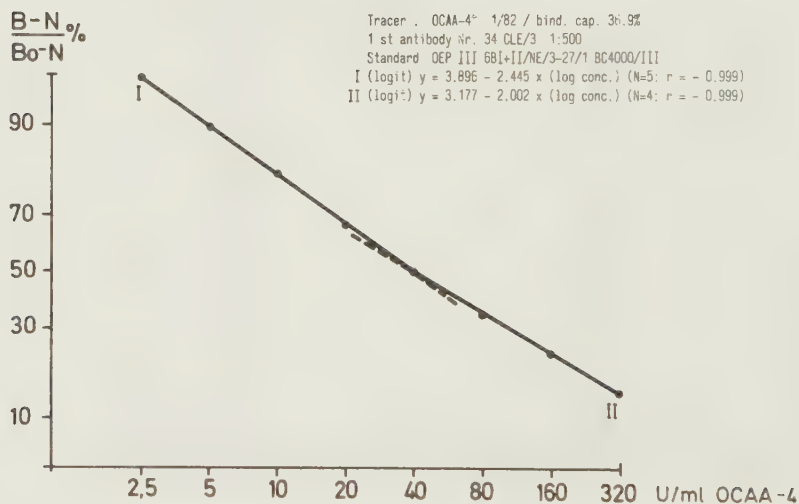


Abb. 30: Prätherapeutische Serum-Konzentrationen von AFP, CEA, Ferritin von Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom

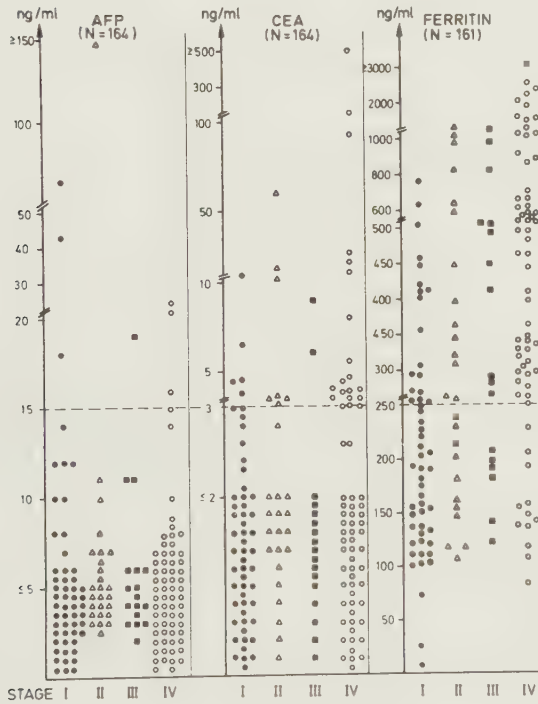


Abb. 31:

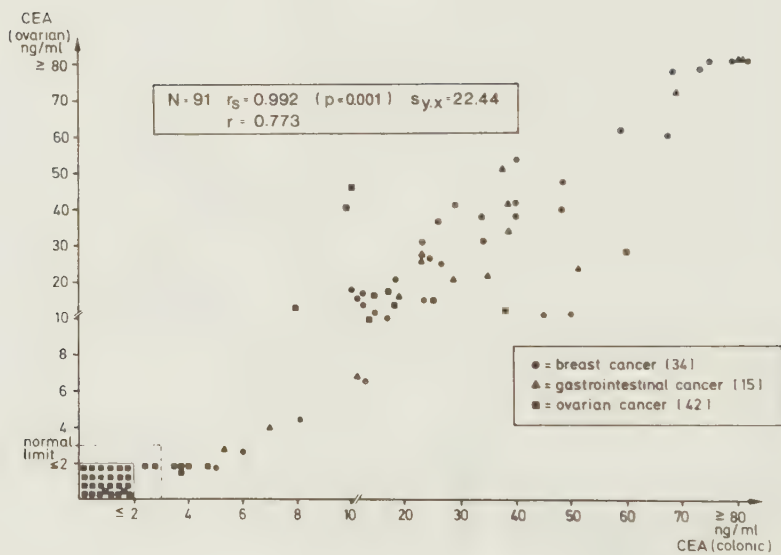
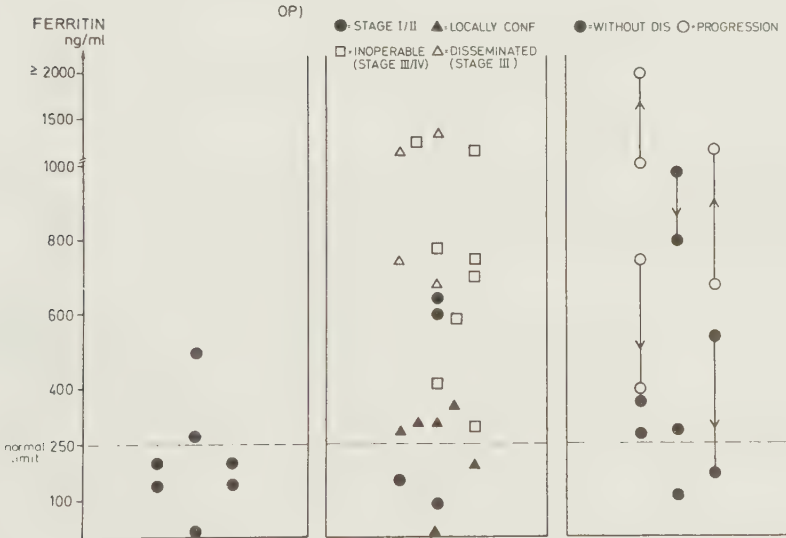


Abb. 32: Ferritinserum-Konzentration vor und nach Operation bei Pat. mit einem Ovarialkarzinom in Abhängigkeit von Stadium und Operabilität.



LITERATURVERZEICHNIS

1. ABELEV, G.J., PEROVA, S.D., KHRAMKOVA, N.J., POSTRIKOVA, L.A., IRLIN, J.S.:
Production of embryonal alpha-globulin by transplantable mouse hepatomes
Transpl. Bull, 1: 174 (1963)
2. ABELEV, G.J.:
Alpha-fetoprotein in autogenesis and its association with malignant tumors
Ad. Cancer Res. 14: 295 (1971)
3. ADDISON, G.M., BEAMISH, M.R., HALES, C.N., HODGKINS, M., JACOBS, A., LLEWLLIN, P.:
An Immunoradiometric Assay for Ferritin in the Serum of Normal Subjects and Patients with Iron Deficiency and Iron Overload
J.clin. Path. 25: 326 (1972)
4. ANGER, H., GLEISENBERGER, U., DITTMAR, F.W.:
Bestimmung von karzinoembryonalem Antigen bei weiblichen Genitalkarzinomen
Arch.Gynäkol. 224: 472 (1977)
5. ATKINSON, B.F., ERNST, C.S., HERLYN, M., STEPLEWSKI, Z., SEARS, H.F., KOPROWSKI, H.:
Gastrointestinal cancer-associated antigen in immunoperoxidase assay.
Cancer Res. 42: 4820 (1982)
6. AUSSEL, C., STORA, C., LAFAURIE, M., KREBS, B., FERRUA, B.:
Changes in ovarian activity during hepatocarcinogenesis by N-2-fluorenylacetamide: role of alpha-fetoprotein
Steroids 34: 631 (1979)
7. AXEN, R., PORATH, J., ERNBACK, S.:
Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides
Nature 214: 1302 (1967)

8. BAGSHAW, K.D., WASS, M., SEARLE, F.:
Glycoproteins in ovarian cancer.
Elsevier/North Holland Biomedical Press. Tumor markers:
Impact and prospects E. Boelsma and Ph. Rümke, editors,
1979
9. BAGSHAW, K.D., WASS, M., SEARLE, F.:
Markers in Gynaecological cancer
Arch. Gynecol. 229: 302, (1980)
10. BAHARI, C.M., LURIE, M., SCHOENFELD, A., COHEN, S.J.:
Ovarian teratoma with peritoneal gliomatosis and elevated
serum alpha-fetoprotein.
Amer.J.Clin.Pathol. 73: 603 (1980)
11. BANWO, O., VERSEY, J., HOHLS, J.R.:
New oncofetal antigen for human pancreas
Lancet i: 643 (1974)
12. BARA, J., BURTIN, P.:
Mucus-associated gastrointestinal antigens in transitional
mucosa adjacent to human colonic adenocarcinomas- their
fetal-type association.
Europ.J.Cancer 16: 1503 (1980)
13. BARA, J., LOISILLIER, F., BURTIN, P.:
Antigens of gastric and intestinal mucous cells in human
colonic tumours.
Brit.J.Cancer 41: 209 (1980)
14. BARBER, H.R.:
Ovarian cancer: Diagnosis and management.
Amer.J.Obste.Gynecol. 150 (8): 910 (1984)
15. BARRELET, V., MACH, J.P.:
Variations of the carcinoembryonic antigen level in the
plasma of patients with gynecologic cancers during therapy.
Amer.J.Obstet.Gynecol. 121: 164 (1975)
16. BAST, R.C., FEENEY, M., LAZARUS, H., NADLER, L.M., COLVIN, R.B.
KNAPP, R.C.:
Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma
J.Clin.Invest. 68: 1331 (1981)

17. BAST, R.C., LAZARUS, H., FEENEY, M., KNAPP, R.C.:
Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma
Am.Assoc.Cancer Res. 21: 207 (1980) (Abstract)
18. BAST, jr., ROBERT, C., THOMAS, L., KLUG, Ph.D., ELENA, St.J.,
R.N., KENISON, E.M.D., JONATHAN, M., NILOFF, M.D., HERBERT
LAZARUS, Ph.D., ROSS, S., BERKOWITZ, M.D., LEAVITT, T.M.D.,
GRIFFITHS, T., M.D., PARKER, L., M.D., ZURAWSKI, R., KNAPP,
R.C.:
A Radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor
the course of epithelial ovarian Cancer
New Engl.J. Med. 309: 883 (1983)
19. BAST, R.C. and KNAPP, R.C.:
Immunologic approaches to the management of Ovarian carcinoma
Sem.Oncol. 11 (3): 264 (1984)
20. BENHAM, F.J., POVEY, M.S., HARRIS, H.:
Placental-like alkaline phosphatase in malignant and benign
ovarian tumors
Clin.Chim.Acta 86: 195 (1978)
21. BHATTACHARYA, M., BARLOW, J.M.D.:
Immunologic studies of human serous cystadenocarcinoma of
ovary
Demonstration of Tumor-associated antigens
Cancer 31: 588 (1973)
22. BHATTACHARYA, M., BARLOW, J.M.D.:
An Immunologic comparison between serous cystadenocarcinoma
of the ovary and other human gynecologic tumors
Am.J.Obstet. Gynecol. 117: 849 (1973)
23. BHATTACHARYA, M., BARLOW, J., TSANN MING CHU, PIRER, M.:
Tumor-associated antigen (s) from granulosa cell carcinomas
of the ovary
Cancer Res. 34: 818, (1974)
24. BHATTACHARYA, M., BARLOW, J.J.:
Tumor markers for ovarian cancer.
Internat.Adv.Surg.Oncol. 2: 155 (1979)
25. BHATTACHARYA, M., BARLOW, J.J.:
Ovarian cancer
In: R.B. HERBERMAN, INTIRE K.R.Mc (Eds)
Immundiagnosis of cancer, M. Dekker Inc.N.Y.Basel 532, 1979

26. BHATTACHARYA, M., CHATTERJEE, S.K., BARLOW, J.J., FUJI, H.:
Monoclonal antibodies recognizing tumor-associated antigen
of human ovarian mucinous cystadenocarcinomas.
Cancer Res. 42: 1650 (1982)
27. BHATTACHARYA, M., CHATTERJEE, S.K., BARLOW, J.J.:
Identification of a human cancer-associated antigen
defined with monoclonal antibody
Cancer Res. 44 (10): 4528 (1984)
28. Bieber CP, Bieber MM:
Detection of ferritin as a circulating tumor associated
antigen in Hodgkin's disease
Nat.Cancer Inst.Monogr. 36: 147 (1973)
29. BIZZARI, J.P., MACKILLOP, W.J., BUICK, R.N.:
Cellular specificity of NB7OK, a putative human ovarian
tumor antigen
Cancer Res. 43: 864 (1983)
30. BLUMENFELD, Z., HEDVIAG, W., THALER, I., DEUTSCH, M.,
BECK, D.:
Increased Alpha-Fetoprotein Levels in Mixed Mesodermal
Tumor of the Ovary
Gynecol.obstet. Invest. 17: 169 (1984)
31. BOLLA, M., BORDES, M., HORIOT, J.C., JAMPOLIS, S., DORZE, C.:
L'antigène carcino-embryonnaire dans les cancers du col utérin
Evolution du dosage en cours d'irradiation et dans les suites
immédiates
La Nouv.Presse med. 6: 2608 (1977)
32. BOLLA, M., VROUSOS, C., HORIOT, J.C., BORDES, M., LEDORZE, C.
L'antigène carcino-embryonnaire dans les cancers du col
uterin
Bull.du cancer 66: 525 (1979)
33. BOLLA, M., VROUSOS, C., HORIOT, J.C., GUERRIN, J., BORDES, M.,
DORZE, C. le.:
L'antigène carcino-embryonnaire dans les cancers du col
uterin. Correlations anatomo-cliniques a propos de 115 cas.
Path.Biol. 27: 611 (1979)
34. BORN, H.J., BAUMANN, R., DERICKSTAN, J.S.:
Significance of CEA determination in gynecological
oncology.
Arch.Gynäk. 224: 471 (1977)

35. BORDES, M., MICHELIS, R., MARTIN, F.:
Detection by immunofluorescence of carcinoembryonic antigen in colonic carcinoma, other malignant or benign tumors, and non-cancerous tissues.
Digestion 9: 106 (1973)
36. BROCK, D.J.H., SUTCLIFFE, R.G.:
Alpha-fetoprotein in the antenatal diagnosis of anencephaly and spina bifida.
Lancet 29: 197 (1972)
37. BUCHEGGER, F., SCHREYER, M., CARREL, S., MACH, J.P.:
Monoclonal antibodies identify a CEA crossreacting antigen of 95kD (NCA-95) distinct in antigenicity and tissue distribution from the previously described NCA of 55 kD.
Int.J. Cancer 33, 643 (1984)
38. BUFFE, D., BIMBAUT, C. et BURTIN, P.:
Presence d'une proteine d'origine tissulaire l'alpha-2H-globuline, dans le serum de sujets atteints d'affections malignes
Int.J. Cancer 3: 850 (1968)
39. BURTIN, P., LAMERZ, R., GENDRON, M.C., MANNOURY, M.Th., SCHNABL, G.:
Immunological comparison of ovarian and colonic CEA
Immunology Letters 4, 87, (1982)
Elsevier Biomedical Press
40. BURTIN, P., SABINE, M.-C., CHAVANEL, G.:
Presence of carcinoembryonic antigen in children's colonic mucosa
Int.J.Cancer 16: 72 (1972)
41. BURTIN, P., CHAVANEL, G., KLEIST, S.V.:
Demonstration in normal human plasma of an antigen that cross-reacts with the carcinoembryonic antigen of digestive tract tumors.
J.Nath.Cancer Inst. 49: 1727 (1972)
42. BURTON, R.M., HOPE, N.J., LUBBERS, L.M.:
A thermostable antigen of ovarian cancer
Fed.Proc. 34: 1036 (1975)
43. BURTON, R.M., HOPE, N.J., LUBBERS, L.M.:
Thermostable antigen associated with ovarian cancer.
Am.J.obstet.gynecol. 125: 472 (1976)

44. BURTON, R.M., HOPE, N.J., BEYERLE, M.P., ESPINOSA, E.:
Tissue antigens in ovarian carcinoma
Oncology 34: 146 (1977)
45. BURTON, R.M., MCGREW, T.L., BARROWS, G.H., BEYERLE, M.P.,
FORTWENGLER, H.P., DAY, T.G., KUHN, J.G., ESPINOSA, E.:
Occurrence of a thermostable antigen of ovarian carcinoma
in normal tissues and secretions.
Cancer 43: 2385 (1979)
46. CHARPIN, C., BHAN, A.K., ZURAWSKI, V.R., SCULLY, R.E.:
Carcinoembryonic antigen (CEA) and carbohydrate determinant
19-9 (CA 19-9) localization in 121 primary and metastatic
ovarian tumors: an immunohistochemical study with the use
of monoclonal antibodies.
Int.J.Gynecol.Pathol. 1: 231, Raven Press, N.Y.,
Internat.Soc. Gynec.Pathol. (1982)
47. CHATTERJEE, S.K., BHATTACHARYA, M., BARLOW, J.J.:
Elevated activity of Cytidine 5-Monophospho-N-Acetylneuraminic
acid Hydrolase in serum of ovarian cancer patients
as a possible indicator of malignancy.
Biochem.Biophys.Res.Comm.80: 826 (1978)
48. CHATTERJEE, S.K., BHATTACHARYA, M., BARLOW, J.J.:
Evaluation of 5-nucleotidase as an enzyme marker in
ovarian carcinoma.
Cancer 47: 2648 (1981)
49. CHATTERJEE, S.K., CHOWDHURY, K., BHATTACHARYA, M.,
BARLOW, J.J.:
Beta-Hexosaminidase activities and isoenzymes in normal
human ovary and ovarian adenocarcinoma.
Cancer 49: 128 (1982)
50. CHATTERJEE, S.K., BHATTACHARYA, M., BARLOW, J.J.:
Murine monoclonal antibodies against galactosyltransferase
from the ascites of ovarian cancer patients.
Cancer Res. 44 (12): 5725 (1984)
51. COLLINS, J.J., BLACK, P.H.:
Specificity of the carcinoembryonic antigen (CEA)
New Engl.J.Med. 285: 175 (1971)
52. CRICHTON, R.R.:
Struktur und Funktion von Ferritin
Angew. Chem. 2 53 (1973)

53. DAMJANOV, I., AMENTA, P.S., ZARGHAMI, F.:
Transformation of an AFP-positive yolk sac carcinoma
into an AFP-negative neoplasm: evidence for in vivo cloning
of the human parietal yolk sac carcinoma
Cancer 53 (9): 1902 (1984)
54. DE BOER, W.C., JNAYMAN, J.M.:
Intestine - associated antigens in ovarian tumours:
an immun.histological Study
Pathologie 13: 547 (1981)
55. DEL VILLANO, B.C., ZURAWSKI, V.R.:
The carbohydrate antigenic determinant 19-9 (CA 19-9):
A monoclonal antibody defined tumor marker
Immunodiagnosics 269 (1983)
56. DISAIA, Ph.J.MD., HAVERBACK, B.J., DYCE, B.J., MORROW,
C.P.:
CEA in patients with gynecologic malignancies
Am.J.Obstet.Gynec. 121: 139 (1975)
57. DISAIA, P.J.:
Overview of tumor immunology in gynecologic oncology
Cancer 38: 566, 1976
58. DISAIA, P.J., MORROW, C.P., HAVERBACK, B.J., DYCE, B.J.:
Carcinoembryonic antigen in cancer of the female repro-
ductive system. Serial plasma values correlated with
disease state.
Cancer 39: 2365 (1977)
59. DOLD, U.W., SACK, H.:
Prakt. Tumorthherapie, Thieme Stuttgart, 1976
60. DONALDSON, E.S., VAN NAGELL, J.R., PURSELL, S., GAY, E.C.,
MEEKER, W.R., KASHMIRI, R., van de VOORDE, J.:
Multiple biochemical markers in patients with gynecologic
malignancies
Cancer 45: 948 (1980)
61. DRYSDALE, J.:
Ferritin in cancer biochemical perspectives. In: Lehmann,
F.G. (Ed.) Carcino-embryonic Proteins.
Vol. I, 249, Elsevier/North-Holland Biochemical Press (1979)

62. DUFOUR, D., BARRETEE, D., TREMBLAY, A.:
Localisation d'alpha-foetoprotéine du liquide amniotique dans les cellules de la lignée érythroblastique du foie et du sang embryonnaire du rat.
Rev. d'Immunol. 33: 315 (1969)
63. EDYNAB, E.M., OLD, L.J., VRANA, M., LARDIS, M.:
A fetal antigen in human tumours detected by an antibody in the serum of cancer patients
(Abst.) Proc.Amer.Ass.Cancer Res. 11, 22 (1970)
64. EPEKETOS, A.A., SHEPERD, J., BRITTON, K.F., MATHER, S., TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J., GRANOWSKA, M., DURBIN, H., NIMMON, C.C., HAWKINS, L.R., MALPAS, J.S., BODMEV, W.F.:
123-J radioiodinated antibody imaging of occult ovarian cancer
Cancer 55 (5): 984 (1985)
65. ESTERHAY, R.J.Jr., SHAPIRO, H.M., SUTHERLAND, J.C., McINTIRE, K.R., MIERNIK, P.H.:
Serum-alpha-fetoprotein concentration and tumor growth disassociation in a patient with ovarian teratocarcinoma.
Cancer 31: 855 (1973)
66. FETTIG, O.:
Epidemiologie und Früherkennung des Ovarialkarzinoms.
Med.Klinik 80 (21): 588, (1985)
67. FISHMAN, W.H., INGLIS, W.H., STOBACH, L.L., KRAUT, M.J.:
A serum alkaline phosphatase isoenzyme of human neoplastic all origin
Cancer Res. 28, 150 (1968)
68. FRITSCHKE, R., MACK, J.-P.:
Identification of a new oncofoetal antigen associated with several types of human carcinomas
Nature 258: 734 (1975)
69. FRENKEL, E.J., BELD, B. van, van OOST, B.A., MARX, J.J.M.:
Influence of heat treatment on rabbit liver ferritin
Biochim.Biophys.Acta 745, 202 (1983)
70. GAFFAR, S.A., PANT, K.D., BENNETT, S.J., GOLDENBERG, D.M.:
Experimental studies of tumor radioimmunodetection using antibody mixtures against carcinoembryonic antigen (CEA) and colon-specific antigen -p(CSAp).
Int.J. Cancer 27, 101 (1981)

71. GERBER, M.A., FAIFERMAN, I., COHER, C.J., KOFFLER, D.:
Studies on xenogenic antisera to tumor-associated
antigen of ovarian carcinoma
Clin.Immunol.Imm.-pathol. 8: 171 (1977)
72. GOLD, P., FREEDMAN, S.O.:
Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic
immunological tolerance and adsorption techniques
J.exp.Med. 121: 439 (1965)
73. GOLDENBERG D.M.:
Identification of beta-oncofetal antigens in cervical
squamous cancer and its demonstration in neoplastic and
normal tissues
Cancer Res. 38: 1246 (1978)
74. GOLDENBERG, D.M., PEGRAM, C.A., VAZQUEZ, J.J.:
Identification of a colon-specific antigen (CSA) in normal
and neoplastic tissues.
J.Immunol. 114: 1008 (1975)
75. GOLDENBERG, D.M., KIM, E.E., DELAND, F.H., BENNETT, S.,
PRIMUS, F.J.:
Radioimmuno-detection of cancer with radioactive antibodies
to carcinomembryonic antigen
Cancer Res. 40: 2984 (1980)
76. GRABAR, P., WILLIAMS, C.A.:
Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés electro-
phorétiques et immunologiques d'un mélange de protéines,
application au sérum sanguin
Biochem.Biophys. Acta 10: 193 (1953)
77. GRABAR, P., WILLIAMS, C.A.:
Etudes sur les protéines à l'aide méthodes immuno-chimiques
Bull.Soc.Chim.biol. (Paris) 36: 65 (1943)
78. GRANICK, S.:
Structure and physiological functions of ferritin
Physiol. Rev. 31: 489 (1951)
79. HAZARD, J.T., TOKOTA, M., AROSIO, P., DRYSDALE, J.W.:
Immunologic differences in human iso-ferritins:
implications for immunologic quantitation of serum ferritin
Blood 49: 139 (1977)

80. HAZARD, J.T., DRYSDALE, J.W.:
Ferritinaemia in cancer
Nature 265: 755 (1977)
81. HAEKKIVEN, J.P.:
Differentiation of antigenic gastric cancer sulphopoly-
saccharide from metaplastic "intestinal" type sulphopoly-
saccharide
Scand.J. Gastroent. 2: 39 (1967)
82. HEALD, J., BUCKLEY, C.H., FOX, H.:
Immunohistochemical study of the distribution of carcino-
embryonic antigen in epithelial tumours of the ovary.
J.clin.Pathol. 32: 918 (1979)
83. HIJMANS, W., SCHUIT, H.R., KLEIN, F.:
An immunofluorescent procedure for the detection of
intracellular immunoglobulins
Clin. Exp. Immunol. 4: 457 (1969)
84. HILL, R., DAUNTER, B., KHOO, S.K., MACKAY, E.V.:
Nature of carcinomembryonic antigen purified from
malignant ascitic fluid of serous adenocarcinoma
of the ovary.
Mol.Immunol. 18: 647 (1981)
85. HIRAI, H., NOISKI, S., WATEBE, H., TSUKADA, Y.:
Some chemical, experimental and clinical investigation
of alpha-fetoprotein
Gann.Monogr. on Cancer Res. 14: 19 (1973)
86. HIRSCHMARIE, H., BARA, J., LOISILLIER, F., BURTIN, P.:
Evidence of pepsinogens in ovarian tumors.
Europ.J.Cancer 14: 593 (1978)
87. HUNTER, W.M., GREENWOOD, F.C.:
Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone
of high specific acitivity
Nature 194: 495 (1962)
88. IMAMURA, N., TAKAHASHI, T., LLOYD, K.O., LEWIS, J.L., OLD, L.J.:
Analysis of human ovarian tumor antigens using heterologous
antisera: detection of new antigenic systems.
Int.J.Cancer 21: 570 (1978)

89. ISLUTUM, K., NIITSU, Y., WATANABE, N., KOSELIN, J., OIKAWA, J. KHDONO, Y., ISKIU, T., GOTO, Y., ONODERA, Y., URUSHIZAH, J.:
Clinical evaluation of serum ferritin for serodiagnosis of cancer.
In: Lehmann, F.G. (Ed.), Carcino-embryonic-proteins
Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Vol. I, 279, (1979)
90. ITO, H., KURIHARA, S., NUSHIMURA, C.:
Serum carcinoembryonic antigens in patients with carcinoma of the cervix.
Obstet.Gynecol. 51: 468 (1978)
91. ITO, H., TAKAGI, Y., ANDO, Y., KUBO, A., HASHIMOTO, SH., TSUTSUI, F., KURIHARA, S.:
Serum ferritin levels in patients with cervical cancer
Obstet.Gynecol., 53: 358 (1980)
92. KABAWAT, S.E., BAST, R.C.Jr., WELCH, W.R., KNAPP, R.C., COLLIN, R.B.:
Immunopathologic characterization of a monoclonal antibody that recognizes common surface antigens of human ovarian tumors of serous, endometrioid and clear cell types.
Am.J.Clin.Path. 79: 98 (1983)
93. KEW, Mc., TORRANCE, J.D., DERMAN, D., SIMON, M., MACNADS, G.M., CHARLTON, R.W., BOTHWELL, Th.:
Serum and tumour ferritins in primary liver cancer
Gut. 19: 294 (1978)
94. KHOO, S.K., WARNER, N.L., KIL, J.T., MACKAY, I.R.:
Carcinoembryonic activity of tissue extracts: a quantitative study of malignant and benign neoplasms, cirrhotic liver, normal adult and fetal organs.
Cancer 34: 542 (1974)
95. KHOO, S.K., MACKAY, E.V.:
Carcinoembryonic antigen (CEA) in ovarian cancer: Factors influencing its incidence and changes which occur in response to cytotoxic drugs.
Bj.J.Obstet.Gynaecol. 83: 753 (1976)
96. KHOO, S.K., WHITAKER, S., JONES, I., MACKAY, E.:
Predictive value of serial carcinoembryonic antigen levels in long-term follow-up of ovarian cancer
Cancer 43: 2471 (1979)

97. KJORSTAD, K.E., ØRJASETER, H.:
Studies on carcinoembryonic antigen levels in patients
with endocarcinoma of uterus
Cancer 40: 2953 (1977)
98. KJORSTAD, K.E., ØRJASETER, H.:
Carcinoembryonic antigen levels in patients with squamous
cell carcinoma of the cervix
Obstet.Gynecol. 51: 536 (1978)
99. KLAPDOR, R., KLAPDOR, U., BAHLO, M., DALLEK, M., KREMER, B.,
van ACKERN, H., SCHREIBER, H.W., GRETEN, H.:
Ca 12-5 bei Karzinomen des Verdauungstraktes.
Ein Vergleich mit Ca 19-9 und CEA bei Karzinomen des
Pankreas und Kolon.
Dtsch.Med.Wschr. 109: 1949 (1984)
100. KLUG, T.L., BAST, R.C., NILOFF, J.M., KNAPP, R.C., CURAWSKI,
V.R.:
Monoclonal antibody immunoradiometric assay for an antigenic
determinant (CA 125) associated with human epithelial
ovarian carcinoma
Cancer Res. 44: 1048 (1984)
101. KÖHLER, G., MILSTEIN, C.:
Continued cultures of fused cells secreting antibody of
predefined specificity
Nature 256: 495 (1975)
102. KNAUF, S., URBACH, G.I.:
Ovarian tumor-specific antigens
Am.J.Obstet.Gynec. 119: 966 (1974)
103. KNAUF, S., URBACH, G.I.:
Purification of human ovarian tumor-associated antigen
and demonstration of circulating tumor antigen in patients
with advanced ovarian malignancy.
Amer.J.Obstet.Gynecol. 127: 705 (1977)
104. KNAUF, S., URBACH, G.I.:
Development of a double-antibody radioimmunoassay for
detecting ovarian tumor-associated antigen fraction
UCA in plasma
Am.J.Obstet.Gynecol. 131: 780 (1978)

105. KNAUF, S., URBACH, G.I.:
A study of ovarian cancer patients using a radioimmuno-
assay for human ovarian tumor-associated antigen OCA.
Amer.J.Obstet.Gynecol. 138: 1222 (1980)
106. KNAUF, S., URBACH, G.I.:
Identification, purification and radioimmunoassay of
NB/70k, a human ovarian tumour-associated antigen
Cancer Res. 41: 1351 (1981)
107. KOPROWSKI, H., STEPLEWSKI, Z., MITCHELL, K., HERLYN, M.,
HERLYN, D., FUHRER, B.:
Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma anti-
bodies.
Somatic Cell Genetics 5: 947 (1979)
108. KRALY, D.H., KOH, S.H., HAY, D.L., CAUCHI, M.N.:
Oncofetal antigens in ovarian cyst fluids.
Gynecol.Obstet.Invest. 18: 117 (1984)
109. KRUPPEY, J., WILSON, T., FREEDMANN, S.O., GOLD, P.:
The preparation of purified carcinoembryonic antigen
of the human digestive system from large quantities of
tumor tissues.
Immunochem. 9: 617 (1972)
110. LAHOUSEN, M., STETTNER, H., PICKEL, H., PORSTNER, P., URDL, W.:
Serumferritin und carcinoembryonales Antigen beim Ovarial-
karzinom
Tumor Diagn. Ther. 5: 229 (1984)
111. LAMERZ, R., FATEH-MOGHADAM, A.:
Carcinofetale Antigene I. Alpha-Fetoprotein
II. Carcinoembryonales Antigen (CEA)
Klin.Wschr. 53: 147, 193 (1975)
112. LAMERZ, R., RUIDER, H.:
Zur Bestimmung des carcinoembryonalen Antigens: Erfahrungen
mit einem neuen Radioimmunoassay.
Z.Anal.Chem. 279: 105 (1976)
113. LAMERZ, R., LEONHARDT, A., EHRHART, H., v. LIEVEN, H.:
Serial carcinoembryonic antigen (CEA) determination in
the management of metastatic breast cancer
Oncodevelopmental Biology and Medicine 1: 123 (1980)

114. LAMERZ, R.:
Ferritin and cancer.
Congreso internacional de pathologia clinica institucional.
XXVIII Congreso nacional de la association espanola de
biopatologia clinica.
Madrid, 14.-17.9.1981 Kongressband II
Editorial Garsi S.A. London-Madrid, S. 63 (1981)
115. LAMERZ, R., BURTIN, P.:
Immunological comparison of carcinoembryonic antigens
(CEA) extracted from tumours of various organs: their
use in radioimmunological CEA determinations.
Br.J. Cancer 47: 823 (1983)
116. LAUFBERGER, V.:
Sur la cristallisation de la ferritin
Bull. Soc. Chim. Biol. 19:1575 (1937)
117. LEHMANN, F.G., LEHMANN, D., MARTINI, G.A.:
Alpha-1-Fetoprotein. Isolierung und Kristallisation aus
menschlichem Plasma.
Clin.Chim.Acta 33: 197 (1971)
118. LEVI, M.M., PARSHLEY, M.S., MANDL, I.:
Antigenicity of papillary serous cystadenocarcinoma
tissue culture cells
Am.J.Obstet.Gynec. 102: 433 (1968)
119. LLOYD, K.O.:
Human ovarian tumor antigens
Serologic analysis of human cancer antigens. Ed.St.A.
Rosenberg, Acad. Press N.Y., 1980
120. LLOYD, K.O.:
Radioimmunoprecipitation procedure for the detection of
human ovarian tumor antigens.
Serologic analysis of human cancer antigens, Ed.St.A.
Rosenberg, Acad.Press N.Y. 1980
121. MAGNANI, J.L., NILSSON, Bo, BROCKHAUS, M., ZOPF, D.,
STEPLEWSKI, Z., KOPROWSKI, H., GINSBURG, V.:
A monoclonal antibody-defined antigen associated with
gastrointestinal cancer is a ganglioside containing sialy-
lated lacto-N-fucopentaose II.
J.Biol.Chem. 257: 14365 (1982)

122. MARCUS, D.M., ZINBERG, N.:
Ferritin. In: Herkerman R.B., Medutire R.R.: Immunodiagnosis of Cancer.
Dekker M. IUC. NY Basel (1979)
123. MAZUR, A., SHORR, E.:
A quantitative immunochemical study of ferritin and its relation to the vasodepressor material
J.biol. Chem. 182: 607 (1950)
124. Mc NEIL, CRICHTON, M., LADDLE, J.N., HELMICK, W.M., TRENTelman, E., WENTZ, M.W.:
An antiserum to ovarian mucinous cyst fluid with colon cancer specificity
Cancer Res. 29: 1535 (1969)
125. MICHAELIS, L.:
Der Acetat-Veronal-Puffer
Biochem. Z. 234: 139 (1931)
126. MING CHU, T.:
Biochemical Markers for Cancer
Marcel Dekker IUC, New York and Basel 1982
127. MIOTTI, S., ABGANNO, S., CANEVARI, S., DIOTTI, A., SONNINO, S., COLNAGHI, M.I.:
Biochemical analysis of human ovarian cancer associated antigens defined by murine monoclonal antibodies.
Cancer Res. 45: 826 (1985)
128. MUNRO, H.N., LINDER, M.C.:
Ferritin: Structure, biosynthesis and role in iron metabolism
Physiol.Rev. 58: 317 (1978)
129. NAGELL v., J.R., MEEKER, W.R.MD, PARKER, J.C., HARRALSON, M.D.:
Carcinoembryonic antigen in patients with gynecologic malignancy
Cancer 55: 1437 (1975)
130. NAGELL v., J.R., QUENTIN, A., PLETSCH, A., GOLDENBERG, D.M.:
A study of cyst fluid and plasma CEA in patients with cystic ovarian neoplasma
Cancer Res. 35: 1433 (1975)

131. NAGELL v., J.R., DONALDSON, B.S., WOOD, E.G., SHARKEY, R.M., GOLDENBERG, D.M.:
The prognostic significance of carcinoembryonic antigen in the plasma and tumors of patients with endometrial adenocarcinoma.
Amer.J.Obstet.Gynecol. 128: 308 (1977)
132. NAGELL v., J.R., DONALDSON, E.S., GAY, E.C., SHARKEY, R.M., RAYBURN, P., GOLDENBERG, D.M.:
Carcinoembryonic antigen in ovarian epithelial cystadenocarcinomas. The prognostic value of tumor and serial plasma determinations.
Cancer 41: 2335 (1978)
133. NAGELL v., J.R., DONALDSON, E.S., GAY, E.C., RAYBURN, P., POWELL, D.F., GOLDENBERG, D.M.:
Carcinoembryonic antigen in carcinoma of the uterine cervix. The prognostic value of serial plasma determinations.
Cancer 42: 2428 (1978)
134. NAGELL v., J.R., DONALDSON, E.S., HANSON, M.B., GAY, E.S., PAVLIK, E.J.:
Biochemical markers in the plasma and tumors of patients with gynecologic malignancies
Cancer 48: 495 (1982)
135. NOUWEN, E.J., POLLET, D.E., SCHELSTRAETE, J.B., EERDEKENS, C., HANSCH, A., van de VOORDE, A., BROE de, M.E.:
Human placental alkaline phosphatase in benign and malignant ovarian neoplasia
Cancer Res. 45: 892 (1985)
136. OUCHTERLONY, O.:
Diffusion-in-gel methods for immunological analysis
Progress in Allergy 6: 3 (1962)
137. OUCHTERLONY, O.:
Diffusion-in-gel methods for immunological analysis
Progress in Allergy 5: 1 (1958)
138. PANT, K.D., DAHLMAN, H.L., GOLDENBERG, D.M.:
A putative new antigen (CSAp) associated with gastrointestinal and ovarian neoplasia.
Immunol. Commun. 6: 411 (1977)

139. PANT, K.D., ZAMORA, P.O., RHODES, B.A., SACHATELLO, C.R., HAGIHARA, P.F., GRIFFEN, W.O., van NAGELL, J.R., FULKS, R., RAM, M.D.:
Characterization of a common antigen of colorectal and mucinous ovarian tumours, Ccota.
Tumour Biol. 5: 243 (1984)
140. PENDERS, T.J., De ROOIJ-DIJK, H.H., LIEJNSE, B.:
Rapid isolation of ferritin by means of ultracentrifugation
Biochem.Biophys.Acta 168: 588 (1968)
141. PLETSCH, Q.A., van NAGELL, Jr., GOLDENBERG, D.M.:
Characterization of CEA in the plasma and tumours of patients with ovarian cancer
Proc.Am.Assoc.Cancer Res. (Abstr.) 15: 146 (1974)
142. POWELL, L.W., ALPERT, E., DRYSDALE, J.W., ISSELBACHER, K.H.:
Human Isoferritins: Organ specific iron and apoferritin distribution
Brit.J.Haemat. 30: 47 (1975)
143. RAO, G.S., HANJANI, P.:
Association of a 97 kilodalton glycoprotein with human ovarian carcinoma
Cancer Letters 26: 327 (1985)
144. REISSMANN, K.R., DIETRICH, M.R.:
On the presence of ferritin in the peripheral blood of patients with hepatocellular disease
J.clin.Invest. 35: 588 (1956)
145. RODBARD, D., BRIDSON, W., RAYFORD, P.L.:
Rapid calculation of radioimmunoassay results
J.Lab.Clin.Med. 74: 770 (1969)
146. ROGERS, G.T.:
Carcinoembryonic antigens and related glycoproteins, molecular aspects and specificity.
Biochem.Biophys.Acta 695: 227 (1983)
147. ROTHEN, A.:
Ferritin and apoferritin in the ultracentrifuge
J.biol.Chem. 152: 679 (1944)

148. RUOSLAHTI, E., SEPPALA, M.:
Studies of carcino-fetal proteins. III. Development of a radioimmunoassay for alpha-fetoprotein. Demonstration of alpha-fetoprotein in serum of healthy human adults.
Int.J.Cancer 8: 374 (1971)
149. RUTANEN, E.M., LINDGREN, J., SIPPONEN, P., STENMAN, U.H., SAKSELA, E., SEPPALA, M.:
Carcinoembryonic antigen in malignant and nonmalignant gynecologic tumors circulating levels and tissue localization
Cancer 42: 581 (1978)
150. SAMAAN, N.A., SMITH, J.P., RUTLEDGE, F.N., SCHULTZ, P.N.:
The significance of measurement of human placental latogen, human chorionic gonadotropin, and carcinoembryonic antigen in patients with ovarian carcinoma.
Am.J.Obstet.Gynecol. 126: 186 (1976)
151. SANTEN, R.J., COLLETTE, J. FRANCHIMONT, P.:
Partial purification of carcinoembryonic reactive antigen from breast neoplasms using lecting and antibody affinity chromatography.
Cancer Res. 40: 1181 (1980)
152. SCHEIDEGGER, J.J.:
Une micro-méthode de l'immuno électrophorese
Int.Arch.All. 7: 103 (1955)
153. SCHMIEDEBERG, O.: Über das Ferritin und seine diätetische und therapeutische Anwendung
Arch.Exp.Pathol.Pharmak. 33: 101 (1984)
154. SCHMIDT-MATHIESEN, H.:
Gynäkologie u. Geburtshilfe
Schattauer, Stuttgart-New York, 3. Aufl., 1976
155. SELL, A., SOKAARD, H., NORGAARD-PEDERSEN, B.:
Serum Alpha-Fetoprotein as a marker for the effect of post-operative radiation Therapy and/or chemotherapy in eight cases of ovarian endodermal studies tumour.
Int.J.Cancer, 1976

156. SELL, S., SHEPPARD, H.W., Jr., NICKEL, R., STILLMANN, D.,
MICHAELSEN, M.:
Effect of anti-alpha-fetoprotein on alpha-1-fetoprotein
producing rat tumors in vivo and in vitro.
Cancer Res. 36: 476 (1976)
157. SEKIYA, S., INABA, N., IWASAWA, H., KOBAYASHI, O., TAKAMIZAWA,
H., MATSUZAKI, O., NAGAO, K.:
AFP-producing Sertoli-Leydig cell tumor of the ovary
Arch.Gynecol. 236: 187 (1985)
158. SEPPALA, M., TALLBERG, T., EHNHOLM, C.:
Studies on embryo-specific protein. Physiological
characteristic of embryospecific alpha-globulin.
Ann.Med.Exp.Fenn. 45: 16 (1967)
159. SEPPALA, M., RUOSLAHTI, E.:
Alpha-fetoprotein in normal and pregnancy sera.
Lancet I: 375 (1972)
160. SEPPALA, M., RUOSLAHTI, E.:
Alpha-fetoprotein: physiology and pathology during
pregnancy and applications to antenatal diagnosis.
J.Pernat.Med. 1: 104 (1973)
161. SEPPALA, M., PIHKO, H., RUOSLAHTI, E.:
Carcinoembryonic antigen and alpha-fetoprotein in malignant
tumors of the female genital tract.
Cancer 35: 1377 (1975)
162. STANISLAWSKI-BIRENCWAJG, M.:
Specific antigens of rat embryonic serum.
Cancer Res. 27: 1982 (1967)
163. STIGLMAYER, R.:
Carcinoembryonales Antigen in der gynäkologischen Onkologie
Fortschr.Med. 96: 1843 (1978)
164. STIMSON, W.H., Mc ADAM, A., LANG, G., DODD, J.:
Pregnancy associated β -macroglobulin: detection on the
surface of ovarian cancer cell lines

165. STENMAN, U.H., HUHTALA, M.L., KOISTINEN, R., SEPPALA, M.:
Immunochemical demonstration of an ovarian cancer-
associated urinary peptide.
Int.J.Cancer 30: 53 (1982)
166. STONE, M., BAGSHAW, K.D., KARDANA, A., SEARLE, F., DENT, J.:
Beta-human chorionic gonadotropin and carcinoembryonic
antigen in the management of ovarian carcinoma
Brit.J.Obstet.Gynec. 4: 375 (1977)
- TAGLIABUE, E., MEMARD, S., DELLA TORRE, G., BARBANTI, P.,
MARIANICOSTANTINI, R., PORRO, G., COLNAGHI, M.I.:
Generation of monoclonal antibodies reacting with human
epithelial ovarian cancer
Cancer Res. 45: 379 (1985)
168. TALERMAN, A., HAIJE, W.G. BAGGERMAN, L.:
Serum alphafetoprotein (AFP) in diagnosis and management
of endodermal sinus (yolk sac) tumor and mixed germ cell
tumor of the ovary.
Cancer 41: 272 (1978)
169. TARTARINOV, Yu. S.:
New data on the embryospecific antigenic components
of human blood serum.
Fed.Proc. 24: 916 (1964)
170. TARTARINOV, Yu. S.:
Detection of embryonic specific-alpha-globulin in the
blood sera of patients with primary liver tumor.
Vopr.Med.Klim. 10: 90 (1964)
171. TARTARINOV, Y.S., KALASANIKOV, V.V., BORISENKO, S.A.,
GRYZOOVA, I.M., VASIL, N.N., KRAEVSRII, N., KOLYADINA, I.P.,
MAKAROV, O.F., PIGHUGINA, M.N.:
Immunochemical identification of carcinoembryonic antigen
in extracts of ovarian and endocarcinoma and pseudomucinous
cystoma
Bull.experim.Biol.Med. 79: 50 (1975)
172. TROUILLAS, P.:
Immunologie des tumeurs cérébrales: l'antigène carcino-
foetal glial.
Am.Inst.Pasteur 122: 819 (1972)

173. WAHLSTRÖM, T., LINDGREN, J., KORHONEN, M., SEPPÄLÄ, M.:
Distinction between endocervical and endometrial adenocarcinoma with immunoperoxidase staining of CEA in routine histological tissue specimens
Lancet II: Nr. 8153: 1159 (1979)
174. WAHREN, B., ALPERT, E., ESPOTI, P.:
Multiple antigens as marker substances in germinal tumors of the testis
J.Nat.Cancer Inst. 58: 489 (1977)
175. WETZ, K., CRICHTON, R.R.:
Ferritin: Struktur, Funktion und medizinische Aspekte
Blut 27: 275 (1973)
176. WOLF, A., VAHRSON, H., HOS, M.:
Bestimmung der Plasmatibonukleare-Aktivität als diagnostisches Hilfsmittel zur Erfassung von Ovarialkarzinomen.
Ergebnisse einer Doppelblindstudie
Geburtsh.Frauenheilk. 39: 497 (1979)
177. WOLFF, H.P., WEIHRAUCH, T.R.:
Internistische Therapie
Urban & Schwarzenberg 1978
178. WÜRZ, H.:
Tumormarkers in gynaecological cancer
Vortrag bei Tumormarkers in cancer
2nd int.Conf. on Human Tumormarkers
Wien Febr. 1984
179. YAMASHITA, K., AITTIO, M.L., DAWSON, J.R.:
Characterization of the carcinoembryonic antigen activity associated with cyst fluids of mucinous ovarian cyst-adenocarcinoma
Cancer Res. 39: 1760 (1979)

L E B E N S L A U F

Name: Schnabl Gundula, Ulrike

geb.: 17. Oktober 1953 in Füssen/Allgäu

Eltern: Ernst Schnabl, Journalist
Hilde Schnabl, geb. Loock

Wohnort: 8039 Puchheim, Bäumlstr. 2 d

Schulbildung: 1959 bis 1963 Volksschule Füssen
1963 bis 1973 Gymnasium in Füssen
und München
1973 Abitur am Thomas-Mann-Gymnasium München

Studium: Wintersemester 1973 bis Wintersemester 1979
Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-
Universität München
Staatsexamen am 2. Nov. 1979
Erteilung der Approbation am 19. Dez. 1979

Berufliche Tätigkeit: Nov. 1979 bis März 1980 Pflegedienst
(Intensivstation) am Krankenhaus r.d.Isar
1. April 1980 bis 30. April 1981
Assistenzärztin (Chirurgie), Kreiskranken-
haus Bogen

Seit 1.2.1982 wiss. Assistentin an der Ludwig-
Maximilians-Universität, Klinikum Großhadern,
Urologische Klinik u. Poliklinik (Direktor:
Prof.Dr.E. Schmiedt)

Herrn Prof.Dr.R. Lamerz danke ich für die Überlassung des Themas, sowie anhaltende Hilfsbereitschaft und wertvolle Ratschläge bei der Durchführung der experimentellen Arbeit.

Herrn Prof.Dr.G. Paumgartner danke ich für die Übernahme des Coreferates.

Zu großem Dank bin ich Herrn Prof.Dr.K. Richter, Direktor der Universitäts-Frauenklinik verpflichtet, der durch die Bereitstellung von Tumor- u. Normalgeweben u. Seren entscheidende Teile der Arbeit erst ermöglichte.

Herr Dr. A. Leonhardt, Chefarzt der Gynäkologischen Klinik Bad Trissl unterstützte die Arbeit dadurch, daß er die Auswertung seines großen gynäkologisch-onkologischen Krankengutes ermöglichte.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei den medizinisch-technischen Assistentinnen des Forschungslabors der Med. Klinik II, Frau Brandt und Frau Segura, für ihre technische Hilfe bei der Durchführung der experimentellen Arbeit bedanken.

